



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**SUBSTRATO DE ALGODÃO COMO MATRIZ PARA SISTEMA
DE LIBERAÇÃO CONTROLADA ATRAVÉS DE PROCESSO
ENZIMÁTICO.**

JUÇARA PEREIRA HOBOLD

FLORIANÓPOLIS

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Juçara Pereira Hobold

**SUBSTRATO DE ALGODÃO COMO MATRIZ PARA SISTEMA
DE LIBERAÇÃO CONTROLADA ATRAVÉS DE PROCESSO
ENZIMÁTICO.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química.**

Orientador: Prof. Dr. Ayres Ferreira Morgado

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Florianópolis

2011

Juçara Pereira Hobold

**SUBSTRATO DE ALGODÃO COMO MATRIZ PARA SISTEMA
DE LIBERAÇÃO CONTROLADA ATRAVÉS DE PROCESSO
ENZIMÁTICO.**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, Setembro de 2011.

Prof. Dr. Ayres Ferreira Morgado
Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Co-orientador

Prof.Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza

Prof. Dr Agenor Furigo Jr.

Prof^a Dra. Débora Oliveira

Dedico este trabalho aos Meus Pais por nunca medirem esforços para educar suas filhas, em especial a minha mãe Marcia, minha amiga e meu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química por me conceder a oportunidade de obter o título de Mestre em Engenharia Química.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Ayres Ferreira Morgado e Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza pela orientação e disponibilidade dos laboratórios.

Aos meus queridos colegas e amigos do Laboratório de Transferência de Massa – LABMASSA aqui representados por Ana Paula Faria, Andressa Vasques, Adriana Dervanoski, Cleosir da Luz, Crisleine Zottin, Gabriela Sonai, Fabíola Vignola, Ingrid Dittert, Joseane Mello, Maria Fernanda Sonesso, Mariana Frota, Marcelo Perfeto, Renato Strelau, Ricardo Zottis, Thiago Bonetti em especial às minhas amigas Munique Dias e Aline Pimentel, agradeço pelas horas de conversas sérias e alegrias compartilhadas.

Ao Diogo Klein ficam os meus sinceros agradecimentos pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, que mesmo estando sempre distante fisicamente, sempre me apoiou.

À minha amiga Marilda Pereira pelos conselhos, força e ajuda prestada no meu histórico profissional.

Ao meu amigo, noivo e companheiro Francisco Hillesheim pelo apoio e incentivo durante toda a execução deste trabalho.

Enfim, a todos com quem convivi durante a realização do mestrado, muito obrigada!

*“Ignore tudo aquilo que vier apagar seu sorriso. Proteja o bom humor e
otimismo.”*
Autor Desconhecido.

RESUMO

A celulose é um polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas unidas entre si por ligações de hidrogênio. Este polímero pode ser hidrolizado por enzimas celulasas quando submetido a condições de temperatura e umidade específicas. Com o uso de agentes reticulantes, como o glutaraldeído, as enzimas celulasas podem ser imobilizadas em matriz de algodão através da formação de ligações cruzadas entre as hidroxilas presentes na celulose e os grupos de resíduos de aminoácidos localizados na estrutura protéica da enzima. Partindo destes princípios, este trabalho propôs estudar um mecanismo de liberação controlada formado através da fixação de corantes sintéticos e naturais em tecido de algodão felpudo e da imobilização de enzima celulase no substrato celulósico. Os corantes sintéticos foram escolhidos por se tratarem de moléculas mais estáveis quando comparados ao uso de corantes naturais, possibilitando maior entendimento sobre o processo estudado. O corante natural utilizado no trabalho foi extraído de rizomas de *Cúrcuma Longa* e sua liberação controlada e propriedade antimicrobiana foram estudadas. Para o monitoramento da ação da enzima imobilizada sobre o tecido, foram medidas a liberação dos corantes, açúcares redutores e a concentração de enzima durante a exposição do tecido de algodão felpudo em uma solução que imita o suor humano. O aumento gradativo de ambos os parâmetros analisados durante a exposição do tecido em solução que imita o suor humano, confirmaram a viabilidade de uso do algodão como matriz natural para sistemas de liberação controlada.

ABSTRACT

Cellulose is a polysaccharide composed of glucose molecules linked by β -1,4-glycosidic connections linked together by hydrogen bonds. This polymer can be hydrolyzed by cellulase enzymes when submitted to specific conditions of temperature and humidity. With the use of crosslinking agents such as glutaraldehyde, cellulase enzymes can be immobilized in a matrix of cotton through the formation of crosslinks between the cellulose and the hydroxyl groups of amino acid residues located in the protein structure of the enzyme. Based on these principles, this paper proposed a study of controlled release mechanism formed by fixing synthetic dyes and natural cotton terry and immobilization of the enzyme cellulase in cellulosic substrate. The synthetic dyes were chosen because they are molecules more stable when compared to using natural dyes, enabling greater understanding of the process studied. The natural dye is extracted from rhizomes of *Curcuma longa* and its controlled release and antimicrobial properties were studied. To monitor the enzyme action immobilized on the fabric, we measured the release of dyes, sugars and enzyme concentration during exposure of cotton terry in a solution that mimics human sweat. The gradual increase of both parameters analyzed during exposure of the tissue in a solution that mimics human sweat, confirmed the feasibility of using cotton as a natural matrix for controlled release systems.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das enzimas encontradas no complexo celulásico proveniente de <i>Trichoderma reesei</i>	44
Tabela 2: Principais reagentes químicos utilizados nos procedimentos experimentais	60
Tabela 3: Reagentes para o preparo de um gel de Eletroforese de (20x20) cm ²	66
Tabela 4: Resultados da determinação da concentração de proteína do caldo enzimático da enzima novoprime®969.	77
Tabela 5: Picos máximos de absorbância dos corantes reativos.	85
Tabela 6: Absorbâncias iniciais e finais a 425nm de uma solução de cúrcuma em tampão suor e a sua degradação após 60 minutos, sob agitação de 60 rpm a 37°C.....	106

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Determinação do intervalo de tempo de velocidade máxima da atividade da enzima novoprime®969 sobre o papel de filtro Whatman nº1, em tampão acetato 0,05M e pH 5,5 a 55°C. No gráfico é possível observar a variação da concentração de açúcares redutores totais (ART) formada com o tempo.....	79
Gráfico 2: Variação da atividade enzimática total da enzima novoprime®969 em diferentes pH e temperaturas.....	80
Gráfico 3: Atividade total em diferentes temperaturas na presença dos tampões suor e acetato com pH 5,5.	81
Gráfico 4: Atividade total em tampão acetato na presença dos corantes que serão utilizados como compostos modelos a temperatura de 55°C.....	82
Gráfico 5: Atividade endoglucanásica em diferentes temperaturas na presença dos tampões suor e acetato	83
Gráfico 6: Atividade exoglucanásica em diferentes temperaturas na presença dos tampões suor e acetato	83
Gráfico 7: Estimativa concentração de corante adsorvido por grama de tecido.	85
Gráfico 8: Efeito da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído. Soluções 0,08 mg/mL de glutaraldeído permaneceram sob agitação em determinadas temperaturas e as concentrações iniciais e finais de glutaraldeído foram determinadas....	87
Gráfico 9: Efeito da temperatura na reação do glutaraldeído com a celulose (tecido branco). Soluções de glutaraldeído 0,08 mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora nas temperaturas de 10, 25 e 35°C. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento foram adicionadas e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada.....	88
Gráfico 10: Efeito da concentração na reação entre o glutaraldeído e a celulose. Soluções de glutaraldeído 0,08 mg/mL , 0,04mg/mL e 0,03 mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora na temperatura ambiente. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento foram adicionadas e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada.....	89

Gráfico 11: Efeito da presença de corantes na reação entre o glutaraldeído e a celulose. Soluções de glutaraldeído 0,04 mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora na temperatura ambiente. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento e tingidas foram adicionadas e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada..... 90

Gráfico 12: Efeito da presença de corantes na reação entre o glutaraldeído e a celulose. Soluções de glutaraldeído 0,03mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora na temperatura ambiente. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento e tingidos foram adicionados e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada..... 91

Gráfico 13: Concentração de proteína que reagiu como o glutaraldeído presente na fibra. Após a primeira etapa de imobilização com GLU 0,04 mg/mL, este tecido permaneceu em contato com 100mL soluções de enzima diluída a 0°C . Neste período foi possível a obtenção da concentração de enzima que reage com o glutaraldeído adsorvido na celulose..... 92

Gráfico 14: Concentração de proteína que reagiu como o glutaraldeído presente na fibra. Após a primeira etapa de imobilização com GLU 0,03 mg/mL, este tecido permaneceu em contato com 100mL soluções de enzima diluída a 0°C . Neste período foi possível a obtenção da concentração de enzima que reage com o glutaraldeído adsorvido na celulose..... 93

Gráfico 15: Liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho Reativo 23. No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos. 96

Gráfico 16: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho Reativo 23 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento..... 97

Gráfico 17: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 23 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento. 97

Gráfico 18: Liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 141.No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos.	98
Gráfico 19: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberado durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 141 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.	99
Gráfico 20: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 141 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.....	100
Gráfico 21: Liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Azul 21. No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos.	100
Gráfico 22: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberado durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Azul 21 durante 240 minutos.Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.	101
Gráfico 23: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Azul 21 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.....	101
Gráfico 24: Liberação controlada do tecido tingido com o corante natural Cúrcuma. No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos.	105
Gráfico 25: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberado durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante natural Cúrcuma durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.	106

Gráfico 26: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante natural Cúrcuma durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento. 107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura morfológica da fibra de algodão.	36
Figura 2: Síntese da celulose. Fonte: Imagem adaptada de Solomons, 2008.....	37
Figura 3: Ligações de Hidrogênio formadas por camadas de celulose.....	37
Figura 4: A figura mostra o hemiacetal e o aldeído do grupo terminal redutor. Fonte: Rabelo, 2007.....	38
Figura 5: Representação esquemática dos domínios de celulases. Fonte: Figura adaptada de Cavaco-Paulo, 1995.	39
Figura 6: Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose por celulase.....	40
Figura 7: Os dois principais mecanismos de hidrólise enzimática da ligação glicosídica propostos por Koshland (1953).....	41
Figura 8: Desenho esquemático da ação da CBHI e CBHII na superfície da celulose. Ambas as enzimas apresentam domínios de ligação na celulose diferentes, atuando em lados opostos das cadeias quebrando-as em unidades de celobiose.....	43
Figura 9: Túnel de uma celobiohidralase de <i>Trichoderma reesei</i> . Em laranja o resíduo catalítico da celulase.	43
Figura 10: Curvas de progresso de reação para três diferentes concentrações enzimáticas iniciais: 1,7 μ mol/mL (O); 0,85 μ mol/mL (Δ); 0,43 μ mol/mL (\square). Fonte: Lima et al, 2001.	46
Figura 11: Possíveis formas do glutaraldeído em solução aquosa. Fonte: Adaptado de Migneault et al, 2004.	47
Figura 12: Reação do glutaraldeído com a celulose. Fonte: Adaptado de Choi et al., 1999	47
Figura 13: Métodos de imobilização de enzimas. Fonte: adaptação de Pereira, 1985.....	48
Figura 14: Reações do glutaraldeído com proteínas, base de Schiff (1) e Adição de Michael (2). Fonte: Adaptado de Yoshioka et al, 1995.....	48
Figura 15: Reações do glutaradeído com proteínas em condições ácidas ou neutras. Fonte: Migneault et al 2004.	49

Figura 16: Possibilidade de ligação cruzada entre a celulose, enzima e glutaraldeído. Fonte: Cavaco-Paulo et al., 2007	50
Figura 17: Estrutura química dos curcuminóides. Fonte: Çıkrıkçı <i>et al</i> , 2008	51
Figura 18: Estruturas dos principais componentes encontrados no óleo essencial de rizomas de cúrcuma. Fonte: Ohshiro, Kuroyanagi, and Ueno (1990).	52
Figura 19: Comportamento estrutural do corante de cúrcuma de acordo com o pH. Fonte: Tonnesen e Karlsen, 1985.	53
Figura 20: Estruturas químicas dos produtos de degradação obtidos através de uma solução de cúrcuma 0,1M em tampão fosfato pH 7,2 a 37°C. Fonte: Wang et al, 1997	54
Figura 21: Reação de açúcares redutores com o ácido 3,5-dinitro-salicílico. Fonte: Martins, 2005.....	61
Figura 22: Estrutura do corante Coomassie Brilliant Blue BG-250. ...	63
Figura 23: Estrutura química do corante Remazol Vermelho 3B, classificado no Colour Index como C.I. Vermelho Reativo 23 e denominado neste trabalho como “Vermelho 23”.	70
Figura 24: Estrutura química do corante Remazol Vermelho HE7B, classificado no Colour Index como C.I. Vermelho Reativo 141 e denominado neste trabalho como “Vermelho 141”.....	70
Figura 25: Estrutura química do corante Remazol Turquesa G, classificado no Colour Index como C.I. Azul Reativo 21 e denominado neste trabalho como “Azul 141”.	70
Figura 26: Etapas do processo de tingimento do tecido de algodão utilizando os corantes reativos C.I. Reactive Red 23, C.I. Reactive Red 141 e C.I. Reactive Blue 21.	71
Figura 27: Rizoma de Cúrcuma Longa L.	75
Figura 28: (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5 % (β-ME 5%) da enzima novoprime®969 (ENZ), comparada com marcadores de peso molecular (PM). (B) Curva de regressão linear utilizada para estimar o peso molecular dos componentes da enzima novoprime®969.	78

Figura 29: Mecanismo por adição nucleofílica entre a celulose e o corante C.I. vermelho 23. Neste tipo de mecanismo, frequentemente, ocorre uma etapa de eliminação antes da etapa de adição. O corante reativo é catalisado por uma base, então, originando uma dupla ligação com eliminação do grupo de saída. Posteriormente, é adicionado o grupo nucleofílico (CeOH) à dupla, através do mecanismo de adição nucleofílica. Fonte: adaptado de Kimura (2001) e Rosa (2009).....	84
Figura 30: Tecidos de algodão após o tingimento com os corantes C.I Vermelho 23, C.I. Veremelho 141 e C.I. Azul 21.....	86
Figura 31: Tecidos tingidos com C.I. Vermelho Reativo 23 com sem o processo de imobilização.	102
Figura 32: Microscopia eletrônica de varredura dos tecidos tingidos com C.I. Vermelho Reativo 23 com e sem etapas de imobilização, comparados com o tecido sem nenhum tratamento (branco).	103
Figura 33: Imagens de Enzima imobilizada em Celulose obtida no trabalho de Walker et al. (2008) (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (E) Microscopia de Fluorescência.....	103
Figura 34: Tecido tingido com corante natural cúrcuma com e sem o processo de imobilização.	104
Figura 35: Ensaios para avaliação da formação de halos de inibição de tecidos tratados contra bactérias Gram-positivas - Staphylococcus aureus e Staphylococcus epidermidis, e Gram-negativas - Escherichia coli e Salmonella tiphymurium. [A] Tecido branco sem tratamento. [B] Tecido branco com glutaraldeído. [C] Tecido com enzima imobilizada. [D] Tecido tingido com cúrcuma. [E] Tecido tingido com cúrcuma e reticulado com glutaraldeído. [F] Tecido tingido com cúrcuma e com imobilização da enzima.	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

ABS	Azul de bromofenol
APS	Persulfato de amônio
ART	Aar Redutor Total
Azul 21	Corante Remazol Turqueza G ou C.I. Azul Reativo 21
BG	B-Glicosidases ou Celobiasas
Branco	Amostra de tecido branco
BSA	Albumina de Soro Bovino
CBH	Celobiohidralase ou Exoglucanase
C.I.	Colour Index
CMC	Carboximetil celulose
DNS	cido dinitro salicílico
ENZ	Enzima
GLU	Glutaraldeído
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
pH	Potencial Hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (do inglês, SDS <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina
Tris-Base	Tris-hidroximetil aminometano
U	Unidade de Atividade
Vermelho 23	Corante Remazol Vermelho 3B ou C.I. Vermelho Reativo 23
Vermelho 141	Corante Remazol Vermelho HE7B ou C.I. Vermelho Reativo 141
λ_{max}	Comprimento de onda no qual ocorre o máximo de absorção

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	33
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO	33
1.2 OBJETIVOS	34
Objetivo Geral:	34
Objetivos Específicos:	34
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
2.1 ALGODÃO: MORFOLOGIA E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	35
2.2 ENZIMAS CELULOLÍTICAS: PRINCIPAIS TIPOS E MODOS DE AÇÃO	38
2.3 PROCESSOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA	46
2.4 CÚRCUMA	50
2.5 ASPECTOS SOBRE A TRANSPIRAÇÃO HUMANA	56
2.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS MICROORGANISMOS EMPREGADOS NO ESTUDO: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> E <i>Salmonella tiphymurium</i>	57
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 MATERIAIS.....	59
3.1.1 Algodão	59
3.1.2 Enzima	59
3.1.3 Corantes	59
3.1.4 Reagentes químicos	59
3.1.5 Outros materiais e equipamentos.....	59
3.2 PROCEDIMENTOS	61
3.2.1 Determinação de açúcares redutores totais.....	61
3.2.2 Caracterização parcial da enzima	62

3.2.2.1 Determinação da concentração de proteína.....	63
3.2.2.2 Análise dos perfis protéicos por eletroforese SDS-PAGE	65
3.2.2.3 Determinação da dosagem de atividade enzimática.....	67
3.2.3 Tingimento de Tecido de Algodão Felpudo com Corantes Modelo	69
3.2.4 Primeira etapa de imobilização: reticulação da celulose com glutaraldeído.....	72
3.2.4.1 Efeito da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído	72
3.2.4.2 Otimização da concentração de glutaraldeído que reage com a celulose	72
3.2.4.3 Efeito da presença dos corantes modelo durante a reticulação da celulose com glutaraldeído	73
3.2.5 Segunda etapa de imobilização: otimização da concentração de enzima.	73
3.2.6 Liberação controlada dos corantes sintéticos	73
3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	74
3.2.8 Ensaios com o corante natural cúrcuma	74
3.2.8.1 Tingimento do tecido de algodão felpudo com cúrcuma.....	74
3.2.8.2 Imobilização do tecido tingido com corante natural	75
3.2.8.3 Avaliação da liberação controlada do corante natural	76
3.2.8.4 Microscopia eletrônica de varredura do tecido tingido com cúrcuma.....	76
3.2.8.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos tecidos tingidos com corante natural	76

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 77

4.1 ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DA ENZIMA POR ELETROFORESE SDS-PAGE	77
4.2 DOSAGENS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	78
4.3 TINGIMENTO DE TECIDO DE ALGODÃO FELPUDO COM CORANTE SINTÉTICO.....	84

4.4 PRIMEIRA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO: RETICULAÇÃO DA CELULOSE COM GLUTARALDEÍDO	86
4.4.1 Efeito da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído.	86
4.4.2 Efeito da concentração de glutaraldeído que reage com a celulose.	88
4.4.3 Efeito da presença dos corantes modelos na acessibilidade do agente reticulante à fibra.	90
4.5 SEGUNDA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA QUE REAGE COM O AGENTE RETICULANTE PRESENTE NA SUPERFÍCIE DA FIBRA.	91
4.6 LIBERAÇÃO CONTROLADA DOS CORANTES REATIVOS PRESENTES NO TECIDO COM A ENZIMA IMOBILIZADA.	93
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV	102
4.8 ENSAIOS COM O CORANTE NATURAL CÚRCUMA.....	104
4.8.1 Tingimento do tecido de algodão felpudo com cúrcuma e processo de imobilização do tecido.	104
4.8.2 Avaliação da liberação controlada do corante natural	105
4.8.3 Microscopia eletrônica de varredura do tecido tingido com cúrcuma	107
4.8.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos tecidos tingidos.	108
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	111
5.1 CONCLUSÕES	111
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.	112
CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS	129

ANEXO A – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO TRABALHO.	129
ANEXO B - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	130
ANEXO C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELOS MÉTODOS DE BRADFORD (1976) E LOWRY (1951).	132
ANEXO D: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO.	134
ANEXO E: CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS CORANTES SINTÉTICOS	136

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TRABALHO

Nas últimas décadas verificaram-se grandes avanços tecnológicos na indústria têxtil através da introdução de novas tecnologias em todas as etapas do processo de fabrico. São exemplos destes avanços a informática, a eletrônica e a automação, que permitiram uma maior rapidez, economia de matéria prima e energia, maior flexibilização do processo produtivo e principalmente o aumento de produtividade das máquinas.

Atualmente a competitividade da Indústria Têxtil está vinculada principalmente ao desenvolvimento de novos produtos. Cada vez mais os consumidores estão procurando produtos com qualidade e, ao mesmo tempo, com elementos funcionais que lhes permita diferenciar do convencional, ou seja, os chamados “tecidos inteligentes”.

O uso da nanotecnologia é uma das áreas mais promissoras para desenvolvimento de artigos têxteis diferenciados. A aplicação de nanopartículas de prata em tecidos sintéticos e naturais tem sido aplicada em tecidos de algodão para desenvolvimento de características antimicrobianas. Porém, estudos têm demonstrado que a exposição à nanopartículas de prata, usadas em diversas aplicações tecnológicas e militares, compromete a produção de energia pelas células do organismo, podendo afetar a função hepática (Lusa, 2009). Por este motivo, no presente trabalho pretendeu-se estudar um processo capaz tornar possível a liberação compostos naturais com ação antimicrobiana através de uma matriz de algodão felpudo.

O processo compreendeu a fixação de uma molécula sintética em tecido de algodão felpudo com posterior imobilização de enzima celulase para que esta, ao entrar em contato com umidade ou suor humano, pudesse ter ação sobre a celulose liberando fragmentos contendo a molécula sintética. As moléculas sintéticas foram escolhidas para que se pudesse compreender o comportamento da ação da enzima sobre o tecido. Desta forma, na segunda etapa do estudo, o mesmo procedimento foi realizado, porém substituindo moléculas sintéticas por moléculas de corante natural com ação antimicrobiana e seu efeito foi testado.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Estudar um processo de liberação controlada de corantes, sintético e natural, através da imobilização de uma enzima celulase em matriz de algodão e avaliar a eficiência do processo por meio da determinação da concentração de corantes, açúcares redutores e proteínas liberadas.

Objetivos Específicos:

- Caracterizar a enzima comercial novoprime®969 através da técnica de eletroforese SDS-PAGE, da determinação de temperatura e pH ótimos de atuação da enzima, e sua atividade perante diferentes substratos, a fim de avaliar as atividades celulásica total, endoglucanásica, exoglucanásica.
- Estudar e otimizar o processo de imobilização da enzima em tecido de algodão, com ou sem a aplicação de corantes, através do uso de glutaraldeído como agente reticulante.
- Avaliar a liberação controlada dos tecidos tingidos com corantes sintéticos através da medida da concentração de corante, de açúcar redutor e proteínas liberadas.
- Estudar as características superficiais do tecido antes e após o processo de imobilização da enzima celulase e liberação do tecido.
- Substituir os corantes sintéticos por corante natural cúrcuma, utilizando um extrato alcoólico de rizomas de *Cúrcuma longa* como agente corante.
- Imobilizar o tecido tingido com corante natural com a concentração otimizada de agente reticulante e avaliar a liberação do corante natural, observando a concentração de corante, de açúcar redutor e proteínas liberadas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do tecido tingido com cúrcuma após o processo de imobilização enzimática perante os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os conceitos fundamentais relacionados ao presente trabalho, que visam facilitar a compreensão do mesmo, são apresentados neste capítulo.

A revisão inicia com a descrição de alguns aspectos sobre a composição e características estruturais do algodão. Posteriormente uma revisão sobre enzimas celulolíticas, mostrando quais os principais tipos e seus mecanismos de ação haverá uma abordagem sobre os processos de imobilização enzimática, dando um enfoque maior à atuação do agente reticulante glutaraldeído perante a presença de celulose e enzimas.

Como um dos objetivos deste trabalho será a avaliação da atividade antimicrobiana do corante natural cúrcuma liberado pelo processo criado, aspectos como a composição química do corante e sua aplicação em diferentes áreas serão destacados neste capítulo.

Por fim, serão abordados alguns aspectos relevantes sobre a fisiologia da pele e os microorganismos estudados. Este item é de fundamental importância, pois o tecido utilizado neste estudo será um tecido de algodão felpudo comumente utilizado para a fabricação de toalhas de banho, e principalmente pelo fato de que será usado como meio para os estudos de liberação controlada uma solução que imita o suor humano.

2.1 ALGODÃO: MORFOLOGIA E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

A planta de algodão pertence à ordem natural das Malváceas ou, em linguagem coloquial, a genes *Gossypium* da família *Mallow*. Ela cresce em climas subtropicais, sendo a maioria cultivada na Ásia, África, Egito, Índia e Américas do Norte e do Sul.

Uma fibra madura de algodão apresenta, em sua estrutura, cutícula, parede primária, parede secundária e lúmen como demonstrado na Figura 1. A camada mais externa da fibra é chamada de cutícula tendo a função de protegê-la, sendo composta por um fino filme de gorduras, pectinas e ceras. Interna a ela está a parede primária, constituída por celulose e por uma porcentagem relativamente alta de outros componentes. A parede primária tem consistência elástica e delimita o comprimento e o diâmetro da fibra. Nesta camada, a celulose

se apresenta na forma de fibrilas dispostas helicoidalmente com um ângulo de 70° em relação ao eixo formando espirais dextróginas e levóginas, que não mudam o sentido ao longo do comprimento da fibra. Em direção ao centro localiza-se a parede secundária, composta principalmente de celulose, sendo que esta diferenciada em três zonas distintas que constituem a maior parte da fibra. A camada mais externa é a S_1 , comparativamente a mais fina, sendo formada por fibrilas orientadas helicoidalmente com um ângulo de 20° a 35° . Nesta região as fibrilas invertem periodicamente a posição da espiral. A zona S_2 , que está situada dentro da S_1 , aponta como a maior em conteúdo celulósico e neste caso as fibrilas estão novamente na forma de hélices com uma região mais baixa em torno de 20° a 30° e que, como as da zona S_1 , são organizadas tal que existem inversões periódicas na direção da espiral. Em um algodão mais maduro, a camada S_3 pode ser observada adjacente à parede do lúmen e é constituída de proteínas e sais minerais derivados da secagem da seiva celular. Por fim, na camada mais interna da parede secundária encontra-se o lúmen que é o canal central da fibra. Normalmente no seu interior encontram-se resíduos de protoplasma e do núcleo (Buckeridge et al., 2008; Bezerra et al., 2010).

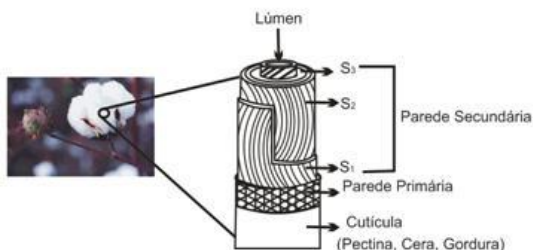


Figura 1: Estrutura morfológica da fibra de algodão.

Fonte: Imagem adaptada de Bezerra et al., 2010

Quando todas as impurezas forem removidas, o principal constituinte da fibra é a celulose. O conhecimento da química desta substância é essencial para a compreensão de tecnologias como o alvejamento, o tingimento e outros acabamentos.

A celulose é um homopolímero linear de alto peso molecular formado por moléculas de glicose. A biosíntese ocorre através da união de duas unidades de glicose adjacentes que são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxílicos, reação esta,

que é catalisada por enzimas específicas. A hidroxila glicosídica do carbono 1 de uma unidade sofre reação de condensação com a hidroxila do carbono 4 de outra unidade, formando a ligação glicosídica do tipo β -(1 \rightarrow 4), dando origem à molécula de celobiose que é a unidade repetitiva da celulose como mostrado na figura 2 (Solomons, 2008):

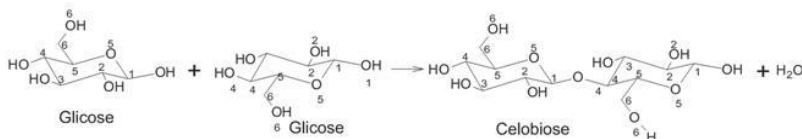


Figura 2: Síntese da celulose.

Fonte: Imagem adaptada de Solomons, 2008.

À medida que novas camadas de celulose são formadas, ocorre uma distribuição uniforme de grupos OH na extremidade de cada cadeia. Quando duas ou mais cadeias de celulose entram em contato, os grupos hidroxilas se alinham em posição ideal para unir integralmente através de ligações de hidrogênio (Figura 3).

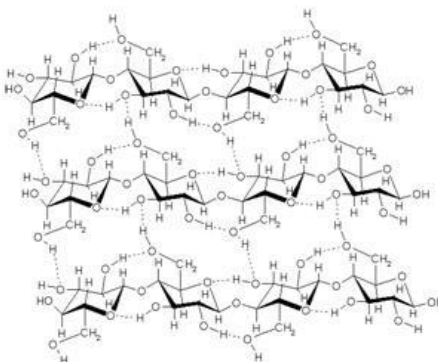


Figura 3: Ligações de Hidrogênio formadas por camadas de celulose.

Fonte: http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/wood/structure_wood_pt1.php

Esta união possibilita a formação de uma estrutura fibrilar de alta cristalinidade, difícil de penetrar por solventes e reagentes (Solomons, 2008). Mas como o processo de síntese ocorre através da catalise por enzimas, a sua ação depende de vários fatores como, por exemplo, a

temperatura. Estruturas podem ser sintetizadas e não apresentarem esta alta cristalinidade, pois durante o período noturno, que apresenta temperaturas mais baixas e ausência de luz, a deposição de celulose ocorre de maneira irregular formando uma zona amorfa (Souza et al, 1995).

A estrutura da celulose pode sofrer quebras na ligação β -(1 \rightarrow 4) glicosídica, e como isto, ocorre a formação de uma cadeia redutora e outra não redutora. A figura 4 mostra a extremidade que apresenta poder redutor e o grupo alcoólico C4-OH terminal que apresenta característica não redutora (Rabelo, 2007):

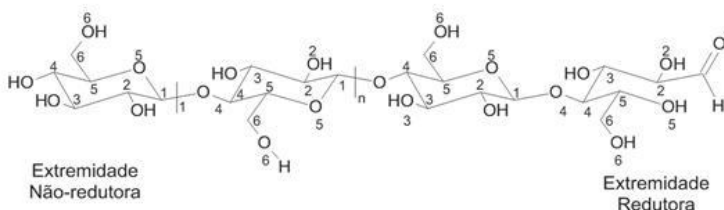


Figura 4: A figura mostra o hemiacetal e o aldeído do grupo terminal redutor. Fonte: Rabelo, 2007.

Os três grupos hidroxila, um primário e dois secundários, em cada unidade de repetição celobiose de celulose são quimicamente reativos. Esses grupos podem sofrer reações de substituição de procedimentos destinados a modificar as fibras de celulose, ou na aplicação de tintas e revestimentos para reticulação. Os grupos hidroxila também servem como locais principais para sorção de moléculas de água através de ligações de hidrogênio (Cotton Technical Guide, 2010).

2.2 ENZIMAS CELULOLÍTICAS: PRINCIPAIS TIPOS E MODOS DE AÇÃO

As celulasas são enzimas derivadas de processos naturais de fermentação capazes de catalisar a hidrólise da celulose. Assim como outras enzimas, possuem uma estrutura tridimensional protéica, constituída por aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas (Fersht, 1984). Elas são constituídas por dois domínios, funcionais e estruturalmente distintos. Possuem um domínio catalítico

(que constitui a maior parte da proteína), que é onde ocorre a cisão hidrolítica das cadeias de celulose, e outro domínio chamado de CBD (“Cellulose Binding Domain”) que é responsável pela ligação da enzima ao substrato. Estes estão ligados entre si através de um polipeptídeo chamado de “linker”. O CBD adere à microfibrila e provoca uma desorganização local na estrutura cristalina da fibra aumentando a exposição das moléculas de celulose e facilitando a catálise. O “linker” posiciona o sítio catalítico onde houve essa desordenação provocada pelo CBD. A figura 5 mostra uma representação esquemática dos domínios das celulasas (Cavaco-Paulo,1995).



Figura 5: Representação esquemática dos domínios de celulasas.

Fonte: Figura adaptada de Cavaco-Paulo, 1995.

Na realidade, uma enzima de celulase é uma mistura de diversos componentes enzimáticos, formando o que se denomina “complexo enzimático”, atuando de forma sinérgica na degradação da celulose (Fersht,1984). Elas são classificadas pela Enzyme Commission (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada (Anand e Vithayathil, 1989). Podendo ser classificadas também de acordo com sua ação catalítica e suas propriedades estruturais (Takashima,1999; Lynd et al, 2002)

Os três maiores tipos de atividade enzimática encontradas são (Castro e Pereira Jr, 2010): as endoglucanases (EC 3.2.1.4)(EGs) ou endocelulasas (1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase), as celobiohidralases (EC 3.2.1.91) (CBHs) ou exocelulasas (1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase) e as β -glicosidasas (EC 3.2.1.21)(BGs) ou celobioses (β -glicosídeo gluco-hidrolase).

Cada componente atua de forma específica (Figura 6). Primeiramente as endoglucanases atacam as ligações β -1,4-glicosídica das regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila livre) e um não redutor (quando a hidroxila da molécula da extremidade participa de ligação com a glicose

adjacente)(Lynd et al., 2002; Henrissat et al., 1998). Em seguida as exoglucanases (CBHI) agem nas extremidades redutoras da cadeia, apresentando uma elevada atividade em celulose amorfa e produzindo celobiose. As exoglucanases (CBHII) também podem degradar lentamente as extremidades não redutoras das regiões cristalinas acessíveis do polímero de celulose, produzindo celobiose. Finalmente, as β -glucosidases hidrolisam as cadeias de celo-oligossacarídeos e celobiose, produzindo glicose (Zhang e Lynd, 2004^a; Henrissat et al., 1998; Goyal et al., 1999; Navarrete, 2002). Este processo além de completar a degradação da celulose, também elimina a acumulação de celobiose que atuaria como inibidor das CBHs, na segunda etapa do mecanismo de hidrólise (Lynd et al., 2002).

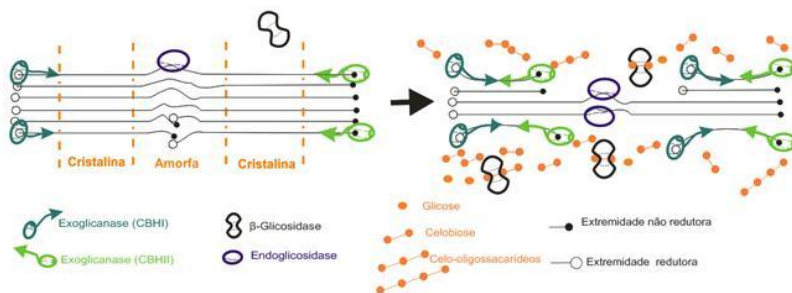


Figura 6: Representação esquemática da hidrólise enzimática da celulose por celulase.

Na figura, as celobiohidralases atacam extremidades não redutoras (CBHII) e as extremidades redutoras (CBHI) das zonas cristalinas. As endoglucanases atacam no meio, o onde está a zona amorfa. Fonte: Adaptação de Henrissat et al., 1998.

A hidrólise enzimática da ligação glicosídica ocorre através de catálise ácida, onde se faz necessário a presença de um doador de prótons e uma base que age como nucleófilo (Figura 7). Esta hidrólise ocorre através de dois mecanismos que dão origem a uma retenção ou uma inversão da configuração anomérica (Koshland, 1953; Henrissat e Davies, 1995). Em ambos os mecanismos de retenção e inversão a posição do doador de prótons é idêntica, ou seja, a distância entre o oxigênio glicosídico e o hidrogênio de ligação é o mesmo. No mecanismo de retenção, a base nucleofílica catalítica está próxima ao carbono anomérico. Já no mecanismo de inversão ela está mais distante,

pois deve acomodar uma molécula de água entre a base e o açúcar. Essa diferença resulta em uma distância média entre os dois resíduos catalíticos que é de 5.5 Å na retenção e de 10 Å no mecanismo de inversão (Carrillo, 2002; Henrissat e Davies, 1995).

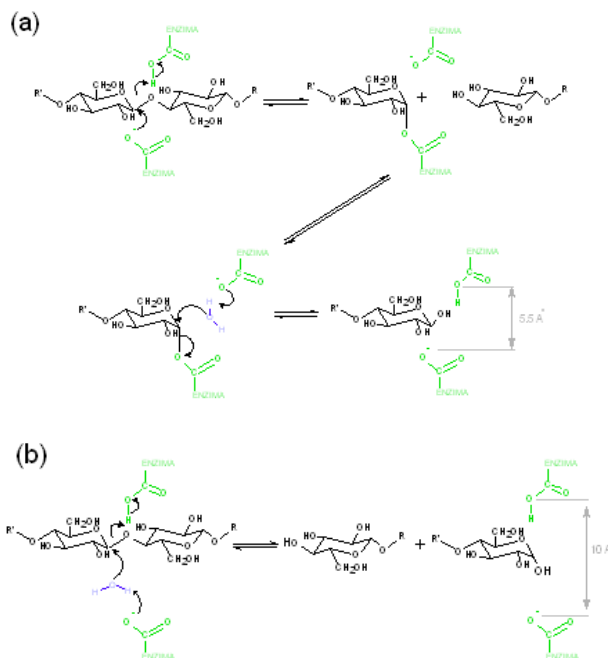


Figura 7: Os dois principais mecanismos de hidrólise enzimática da ligação glicosídica propostos por Koshland (1953).

(a) O mecanismo de retenção em que, através da assistência nucleofílica fornecida pela base(B-), o oxigênio glicosídico é protonado pelo catalisador ácido (AH). Posteriormente a enzima glicosil resultante é hidrolisada por uma molécula de água e esta segunda substituição nucleofílica no carbono anomérico gera um produto com a mesma estereoquímica do substrato.

(b) O mecanismo de inversão, onde a protonação do oxigênio glicosídico é acompanhada por um ataque concomitante de uma molécula de água que é ativado pelo resíduo de base (B-), produzindo um mecanismo de deslocamento simples que produz uma inversão estereoquímica do produto.

Fonte: Adapção de Henrissat e Davies (1995).

As celulasas de *Trichoderma reesei* possuem duas celobiohidralases (CBHI e CBHII), cinco endoglucanases (EGI, EGII,

EGIII, EGIV e EGV) e duas β -glicosidases (BGI e BGII) (Nogawa et al, 2001; Wood, 1992). Quando todas essas enzimas atuam em conjunto apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais. Este efeito é conhecido como sinergia. A literatura cita pelo menos três formas de sinergia entre as celulasas e estes são indicados na figura 6 (Ferst, 1984; Reinikainen, 1994):

- sinergia EG-CBH: quando a endoglucanase atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação de CBH I e CBH II, respectivamente;
- sinergia CBHI-CBHII: quando as CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase;
- sinergias CBH-BG e EG-BG: como seus produtos de hidrólise, a celobio-hidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase.

As exoglucanases são os principais componentes dos sistemas celulásicos de *Trichoderma reesei*, representando cerca de 20-60% do total de proteína celulásica produzida por fungos (Rouvinen et al., 1990).

A necessidade de duas celobiohidralases tem sido atribuída à preferência da CBHI para a extremidade redutora e CBHII para a não-redutora (Figura 8). Através da cristalografia foi possível explicar a existência destes dois tipos de celobiohidralases. A CBHI apresentou quatro linhas de superfície que dão origem a um túnel de 50Å°. Já a CBHII apresentou duas linhas de superfície formando um túnel de 20Å°. Estes túneis mostraram-se essenciais para a clivagem das cadeias redutoras e não-redutoras (Reinikainen, 1994). As figuras 8 e 9 mostram uma representação do túnel de uma celobiohidralase.

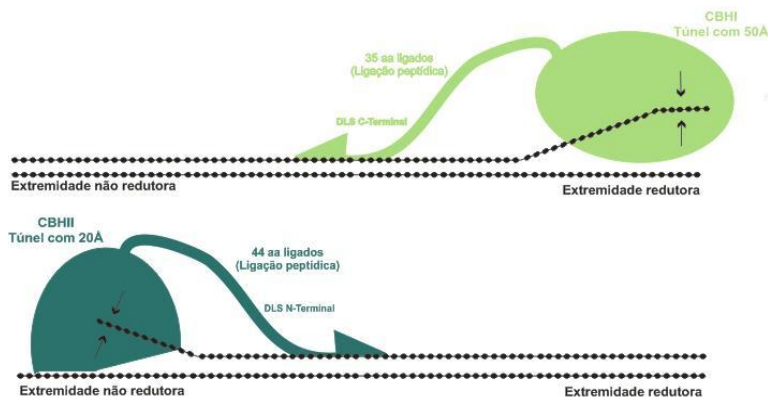


Figura 8: Desenho esquemático da ação da CBHI e CBHII na superfície da celulose. Ambas as enzimas apresentam domínios de ligação na celulose diferentes, atuando em lados opostos das cadeias quebrando-as em unidades de celobiose.

Fonte: Imagem adaptada de HARRIS, 2010

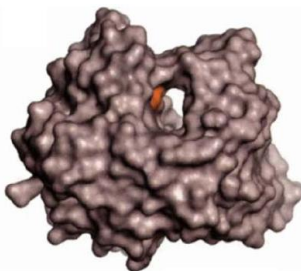


Figura 9: Túnel de uma celobiohidralase de *Trichoderma reesei*. Em laranja o resíduo catalítico da celulase.

Fonte: Uma adaptação de Davies and Henrissat, 1999.

Cada tipo de celulase apresenta uma determinada massa molecular, que pode ser determinada através da técnica de eletroforese. A tabela 1 mostra as principais enzimas, seu tipo e sua respectiva massa molecular encontrada por alguns autores.

Tabela 1: Características das enzimas encontradas no complexo celulásico proveniente de *Trichoderma reesei*.

Enzima	Tipo	Massa molecular (kDa)	Referência
Endoglucanase	-	23,5 - 58,0	Beldman <i>et al.</i> , 1985
	EG I	46,0	Gamerith, 1992
		50,0 - 55,0	Reinikainen, 1994
	EG II	48,0	Gamerith, 1992
		48,0	Reinikainen, 1994
	EG III	25,0	Reinikainen, 1994
	EG VI	55,0	Karlsson <i>et al.</i> , 2002
	EG V	23,0	R Reinikainen, 1994
Exoglucanase (Celobioidrolase)	-	57,0	Selby, 1969
	-	42,0	Berchem <i>et al.</i> , 1975
		60,5 – 62,0	Beldman <i>et al.</i> , 1985
	CBH I	63,0	Gamerith, 1992
		59,0 – 68,0	Reinikainen, 1994
	CBH II	58,0	Gamerith, 1992
		50,0 – 58,0	Reinikainen, 1994
β-glicosidase (Celobiase)	-	76,0	Beldman <i>et al.</i> , 1985
	-	42,0	Berchem <i>et al.</i> , 1975
	BGL I	75,0	Reinikainen, 1994
	BGL II	114,0	Foreman <i>et al.</i> , 2003

Fonte: adaptado de Silva, 2008

Segundo a Enzyme Commission: “uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a formação de 1 μmol de produto por minuto”. Onde a atividade específica é determinada através da unidade de atividade por mg de enzima (King e Campbell, 1961).

Existem vários substratos que são utilizados para avaliar cada tipo de atividade enzimática. Entre os recomendados pela Comissão de Biotecnologia da IUPAC destacam-se (Ghose, 1986): o papel filtro

Whatman #1 que é utilizado para a determinação de atividade total, pois é constituído por fibras de celulose com estrutura complexa e necessita para sua hidrólise total um sistema celulósico completo. Para a determinação da atividade exoglucanásia é utilizado uma celulose microcristalina comercializada como Avicel®. Já para a atividade endoglucanásica é utilizado um derivado solúvel de celulose, a carboximetilcelulose (CMC). Este substrato apresenta grande solubilidade em água e não pode ser hidrolisado extensivamente por celobiohidralases, pois apresenta caráter amorfo. Já para a determinação da atividade de celobiohidralásica é recomendado o uso de celobiose.

A atividade enzimática é influenciada por vários fatores. Dentre os mais importantes estão a temperatura, o pH, a concentração do substrato e a presença ou ausência de inibidores. A atividade enzimática aumenta com o aumento da temperatura até um valor ótimo, a partir deste valor a enzima sofre desnaturação, ou seja, ocorre perda da estrutura tridimensional através da quebra de ligações de hidrogênio e outras ligações não-covalentes. A maioria das enzimas tem um valor de pH ou uma faixa de pH ótimos, acima ou abaixo deste valor a atividade enzimática diminui. Assim quando a concentração de H^+ no meio é trocada, a estrutura tridimensional das proteínas é alterada podendo ocorrer a desnaturação em caso de trocas extremas de pH. Há uma velocidade máxima na qual certa quantidade de enzima pode catalisar uma reação específica. Somente quando a concentração do substrato está extremamente alta esta velocidade máxima pode ser alcançada. Sob condições de alta concentração de substrato, a enzima é dita estar em saturação; ou seja, seu sítio ativo está sempre ocupado por moléculas de substrato ou produto. Após um determinado tempo, muitas das moléculas de enzima estão inativas por falta de substrato; então, a velocidade da reação é provavelmente influenciada pela concentração do substrato.

A concentração de produtos aumenta linearmente com o tempo num dado intervalo (velocidade constante). No entanto, a partir de certo tempo, a velocidade (valor da tangente à curva num dado instante) decresce (Figura 10). Vários fatores podem contribuir para este decréscimo: diminuição da concentração de substrato, inativação parcial da enzima no decorrer da reação, inibição por produto e deslocamento do equilíbrio se a reação for reversível. Para evitar a influência destes fatores costuma-se associar a atividade a medida da velocidade de reação em condição inicial, ou seja, aquela que assegura velocidade constante (Lima et al., 2001; Ceni, 2005).

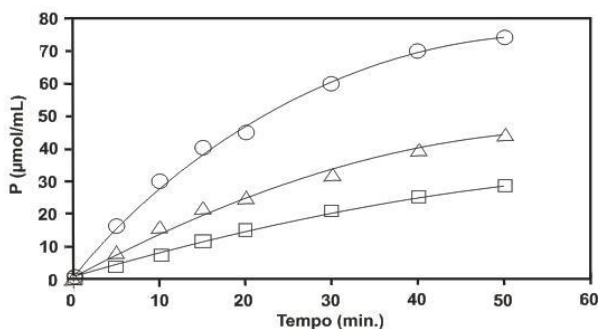


Figura 10: Curvas de progresso de reação para três diferentes concentrações enzimáticas iniciais: $1,7\mu\text{mol/mL}$ (O); $0,85\mu\text{mol/mL}$ (Δ); $0,43\mu\text{mol/mL}$ (\square). Fonte: Lima et al, 2001.

2.3 PROCESSOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA

Para o processo de imobilização podem ser utilizados vários tipos de agentes reticulantes para ligar a molécula desejada ao suporte. Estes reticulantes são moléculas de massa molecular muito menor que o peso molecular da cadeia principal entre duas ligações cruzadas consecutivas e normalmente apresentam, no mínimo, dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas (Berger et al, 2004; Orefice, 2006).

Um agente reticulante interessante é o glutaraldeído, que pode reagir com enzimas através do grupo $\epsilon\text{-NH}_2$ da lisina, formando ligações similares à base de Schiff (Yoshioka et al, 1995), e também com as hidroxilas funcionais da celulose (Choi et al, 1999).

Em solução aquosa o glutaraldeído não se apresenta necessariamente na forma monomérica (estrutura I da figura 11), podendo apresentar-se em pelo menos 13 formas diferentes dependendo das condições, tais como pH, concentração, temperatura, etc (Migneault et al, 2004). É vendido comercialmente em soluções de 25% em água podendo apresentar uma faixa de pH de 3 a 6. Estas soluções aquosas exibem dois picos de absorção no espectro de ultra-violeta. O primeiro a 235nm refere-se às ligações $\alpha\text{-}\beta$ -insaturadas dos dímeros que são formados e 280nm devido a presença do monômero. (Yoshioka et al, 1995).

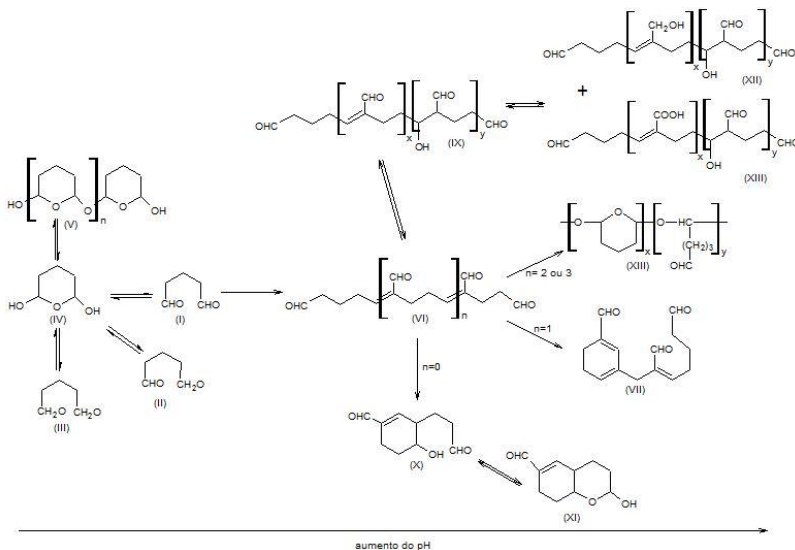


Figura 11: Possíveis formas do glutaraldeído em solução aquosa.

Fonte: Adaptado de Migneault et al, 2004.

A reação de um dialdeído e o tecido de algodão (celulose) forma um acetal como mostra a figura 12(Choi et al., 1999):

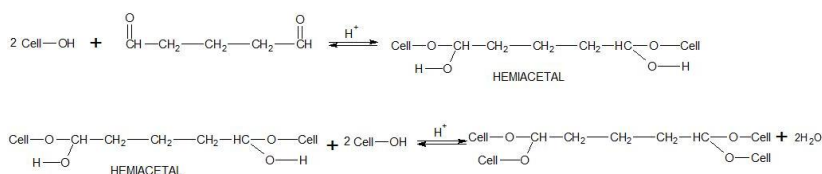


Figura 12: Reação do glutaraldeído com a celulose.

Fonte: Adaptado de Choi et al., 1999

Para imobilizar uma enzima pode-se optar por várias formas. A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (Dalla-Vecchia et al, 2004). A figura 13 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Pereira, 1985).

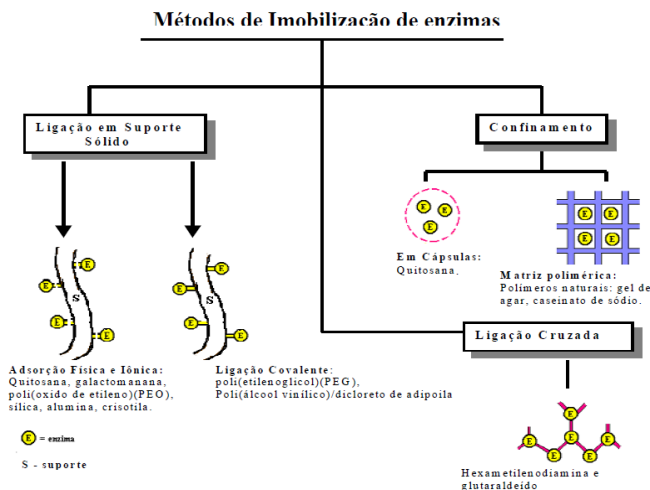


Figura 13: Métodos de imobilização de enzimas.

Fonte: adaptação de Pereira, 1985.

A utilização de glutaraldeído para imobilização de enzima é muito citada na literatura existente, mas ainda não há acordo sobre as principais espécies reativas do glutaraldeído que participam no processo de cruzamento, porque as formas monoméricas e poliméricas estão em equilíbrio. Ele pode formar ligações covalentes cruzadas (“crosslinking”) com vários grupos funcionais de proteínas, como a amino, tiol, fenol e imidazol (Habeeb e Hiramoto, 1968). Podendo reagir com proteínas por vários meios, tais como condensação aldólica ou Adição de Michael, como mostra a figura 14 (Yoshioka et al, 1995):

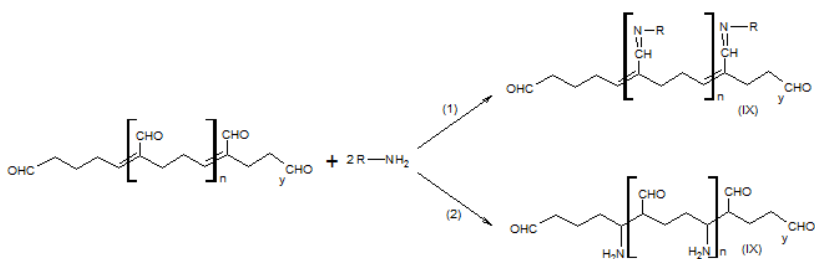


Figura 14: Reações do glutaraldeído com proteínas, base de Schiff (1) e Adição de Michael (2). Fonte: Adaptado de Yoshioka et al, 1995.

Em 1994, Walt e Agayn propuseram vários produtos de reações para diferentes estruturas de glutaraldeído em soluções com diferentes pH's. Dependendo do pH de solução o glutaraldeído apresentou-se em diferentes formas e formou bases de Schiff (através do ataque nucleofílico de resíduos de lisina das proteínas) com diferentes estruturas. A figura 15 mostra as estruturas encontradas para a reação da enzima (proteína) com diferentes formas de glutaraldeído em condições ácidas ou neutras.

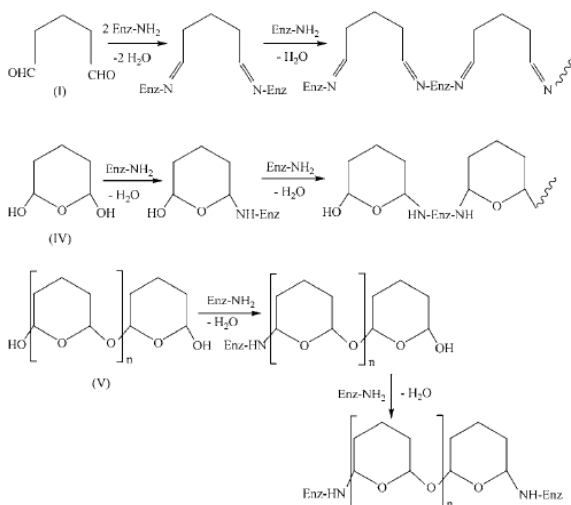


Figura 15: Reações do glutaraldeído com proteínas em condições ácidas ou neutras. Fonte: Migneault et al 2004.

A possibilidade de envolver vários resíduos da enzima no processo de imobilização covalente sobre suporte previamente ativado com grupos aldeídos pode influenciar benéficamente a estabilidade das moléculas de enzima imobilizadas. Todos os resíduos, ao se unirem a uma grande superfície do suporte, através de braços espaçadores muito pequenos, estarão obrigados a conservar suas distâncias relativas durante qualquer mudança conformacional, tornando a região da enzima imobilizada muito mais rígida que a mesma região da enzima nativa. Em consequência, toda a molécula de enzima se torna muito mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por agentes desnaturantes (Guisán et al, 1991; Adriano et al, 2003).

Cavaco-Paulo (2007) e seus colaboradores avaliaram a possibilidade da utilização de algodão como matriz para a liberação controlada de corante reativo como composto modelo. O tecido tingido com corante reativo foi revestido com uma enzima celulase imobilizada com glutaraldeído. A liberação do composto modelo foi realizada através da hidrólise das fibras de algodão em tampão suor, onde o aumento da concentração de corante foi observado. Os resultados confirmaram a viabilidade do algodão como matriz natural para sistemas controlados mostrando este método como uma técnica promissora para liberar substâncias em roupas de algodão, como fragrâncias que poderiam ser liberadas pelo suor humano. A figura 16 mostra uma possível ligação cruzada entre a celulose, a enzima e o glutaraldeído citados no trabalho.

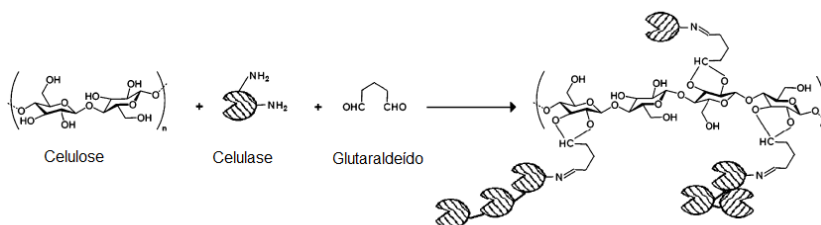


Figura 16: Possibilidade de ligação cruzada entre a celulose, enzima e glutaraldeído. Fonte: Cavaco-Paulo et al., 2007

2.4 CÚRCUMA

A cúrcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta herbácea e perene da família Zingiberaceae, ordem Scitaminae (Shashidhar et al., 1997a), subordem Zingiberoidae (Govindarajan, 1980).

Cúrcuma é um nome derivado do latim - Kourkoum, uma palavra de origem árabe significado açafrão (Monier -Williams, 1997). No Brasil, a espécie *Cúrcuma longa* L. é conhecida como açafrão-da-terra, açafrão-da Índia, batatinha amarela, gengibre dourado e mangarataia (Maia et al., 1995; Cecilio Filho et al., 2000). No meio científico é chamada de cúrcuma ou “turmeric”, para que possa ser diferenciada das espécies *Crocus sativus* (Safron) (Silva, 1994), e a *Carthamus tinctorius* (May et al. 2005), também conhecidas como açafrão.

O açafrão da Índia (*Cúrcuma longa* L) é uma das 70 espécies do gênero *Cúrcuma*, pertencente à família Zingiberiaceae, sendo produzido na Índia, China, Formosa, Indonésia, Java, Filipinas, Caribe, Norte da Austrália e América do Sul. Nas últimas décadas, porém, o açafrão passou a ser cobiçado pelas indústrias química e alimentícia, graças à possibilidade de aplicação de seu extrato como corante natural (SEBRAE – Goiás, 2006).

No Brasil, a região de Mara Rosa-GO é a maior produtora, e conta com mais de 200 produtores de açafrão, sendo que 95% deles são de propriedades de micro e pequeno porte. A produção brasileira corresponde a 1% de tudo o que se produz no mundo, porém, com uma vantagem: a colheita no Brasil é feita na entressafra indiana que é uma das maiores produtoras (SEBRAE-Goiás, 2008).

O rizoma da cúrcuma apresenta pigmentos curcuminóides e óleos essenciais. Os três pigmentos curcuminóides encontrados na cúrcuma são análogos estruturalmente (figura 17), e pertencem à classe diferoluilmetano ($C_{21}H_{20}O_6$). A curcumina, 1,7-bis- (hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, possui dois grupos metoxila (OCH₃), a desmetoxicurcumina apenas um, e a bisdesmetoxicurcumina nenhum (Martins e Rusig, 1992; Almeida, 2006). Os principais corantes componentes da cúrcuma exibem um tautomerismo ceto-enólico. A forma bis-ceto predomina na forma de soluções aquosas ácidas e neutras e na membrana celular, agindo como um doador de prótons. (Wang et al., 1997; Jovanovic et al., 1999).

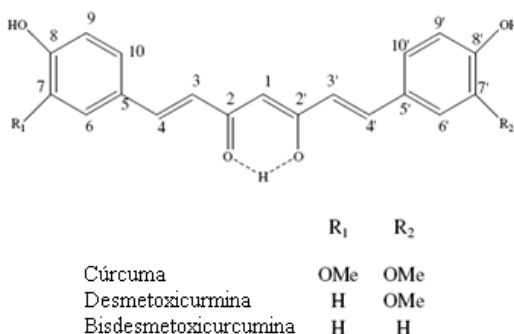


Figura 17: Estrutura química dos curcuminóides.

Fonte: Çikrikçi *et al*, 2008

A quantificação do teor de pigmentos curcuminóides usualmente é feita, após a extração da amostra com etanol por refluxo, por leitura da absorbância a 425 nm em espectrofotômetro (Takahashi, 1987). Esta determinação fornece a concentração de pigmentos totais (Almeida, 2006). Como matéria prima, pode ser utilizado o rizoma cru e fatiado, fatiado e seco ou ainda em pó para facilitar a penetração do solvente e a remoção dos óleos (Govindarajan, 1980).

O óleo essencial contido nos rizomas da cúrcuma é constituído por alcoóis sesquiterpênicos e cetonas, produtos secundários do metabolismo vegetal. A síntese ocorre nas células glandulares ou epiteliais. O óleo fica retido em vacúolos situados no citoplasma. Quando estes são rompidos por danos mecânicos ou físico-químicos, os óleos essenciais ficam livres. Apresentam um baixo ponto de ebulição e um forte aroma (Hess, 1975; Almeida, 2006). Os principais componentes dos óleos essenciais da cúrcuma estão descritos na figura 18:

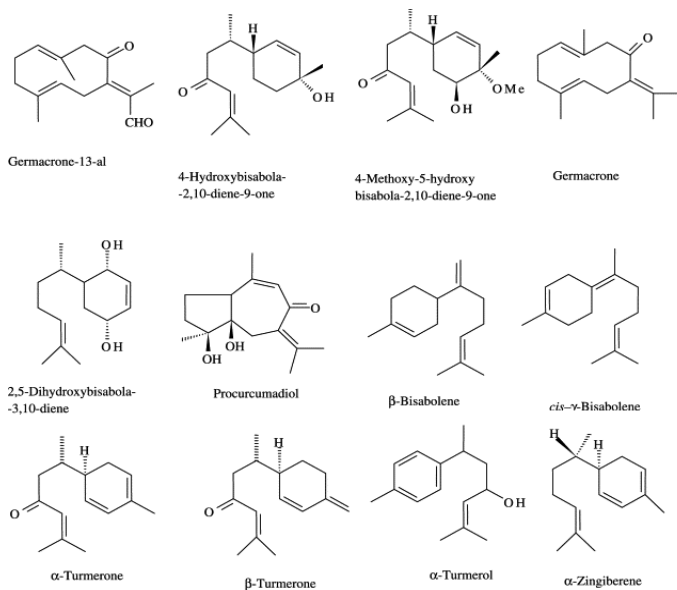


Figura 18: Estruturas dos principais componentes encontrados no óleo essencial de rizomas de cúrcuma. Fonte: Ohshiro, Kuroyanagi, and Ueno (1990).

Em $\text{pH} < 1$, soluções aquosas de cúrcuma apresentaram uma cor vermelha, que indica a forma protonada (H_4A^+) (figura 19). Na faixa de pH 1-7, apresentaram-se na forma neutra (H_3A), e devido a baixa hidrossolubilidade nesta faixa de pH , as soluções ficaram amarelas. Em $\text{pH} > 7,5$ a cor muda para vermelho, ficando nas formas H_2A^- , HA_2^- e A_3^{3-} com valores de pK_a 7,8, 8,5 e 9,0, respectivamente (Tonnesen e Karlsen, 1985).

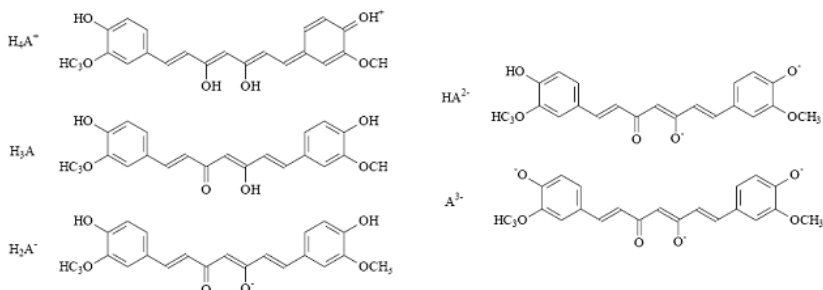


Figura 19: Comportamento estrutural do corante de cúrcuma de acordo com o pH . Fonte: Tonnesen e Karlsen, 1985.

Wang et al. (1997) estudaram a cinética de degradação da cúrcuma em uma faixa de pH de 3 a 10, usando tampão fosfato. Os resultados mostraram que a decomposição da cúrcuma foi dependente do pH , ocorrendo rapidamente em condições neutras e básicas. Quando a cúrcuma foi incubada em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 a 37°C , cerca de 90% foi decomposto em 30 min. Os principais produtos de decomposição foram o trans-6-(4-hidroxi-3-etoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal (em maior quantidade) e em menores quantidades a vanilina, ácido ferúlico, feruloil metano (figura 20).

A cúrcuma, além de largamente utilizada na medicina popular no tratamento de diversas doenças, é também muito citada na literatura pela variedade de atividades que apresenta (Silva Filho et al., 2009), como mostra o quadro 1. Este poder pode ser atribuído principalmente aos componentes fenólicos contidos em sua estrutura que exercem efeito antioxidante. Seus pigmentos apresentam duas hidroxilas fenólicas, sendo um composto β -dicarbonílico, e um grupo dicetona, classes estas, que são consideradas as principais classes de metabólitos responsáveis pelas propriedades do rizoma de cúrcuma, seguidos pelos óleos essenciais (Lachance et al, 1997)

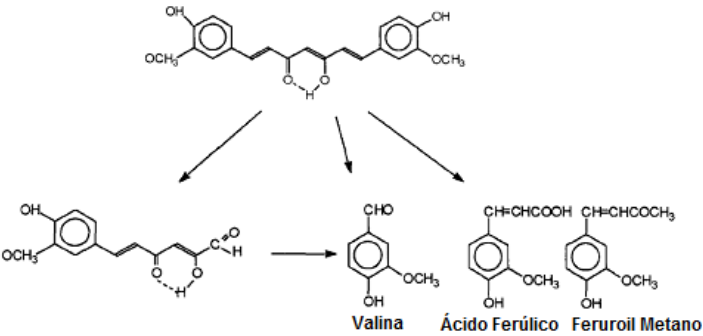


Figura 20: Estruturas químicas dos produtos de degradação obtidos através de uma solução de cúrcuma 0,1M em tampão fosfato pH 7,2 a 37°C. Fonte: Wang et al, 1997 .

Quadro I: Algumas atividades exercidas pela *Cúrcuma Longa* , citadas na literatura.

Atividade	Outras informações	Referência
Antiviral	Inibição de infecção pelo vírus influenza H1N1	Hsu et al, 2010.
	Inibe a replicação do vírus de hepatite B	Ahn et al, 2009.
	Inibe a replicação do vírus HIV	Sui et al, 1993; Barthelemy, et al, 1998.
Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i>	Srinivas et al, 2009; Egan et al, 2004.
	<i>Escherichia coli</i>	Srinivas et al, 2009; Egan et al, 2004.
	<i>Bacillus cereus</i>	Srinivas et al, 2009; Wang et al, 2009.
	<i>Bacillus typh</i>	Jayaprakasha et al, 2005; Yu et al, 2002.
	<i>Bacillus dysenteriae</i>	Jayaprakasha et al, 2005; Yu et al, 2002.
	<i>Bacillus subtilis</i>	Egan et al, 2004; Wang et al 2009.
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Srinivas et al, 2009.

Antifúngica	<i>Aspergillus niger</i>	Wang et al, 2009.
	<i>Penicillium notatum</i>	Wang et al, 2009.
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wang et al, 2009.
Antialérgica	Alergia ao látex	Kurup et al, 2007.
Anticarcinogênica	Câncer de mama	Inano et al, 2000.
	Pulmão, fígado, estômago	Rachana, Shailesh & Girish, 2002.
Antidiabético	Suprime os sintomas associados com diabetes tipo II	Arun et al, 2002.
Antiveneno	Veneno de cobra (<i>Crotalus</i>)	Ferreria et al, 1992.
Anti-inflamatório	<i>Helicobacter pylori</i>	Wipasa et al, 2010.
	Atenuação de isquemia	Yeh et al., 2005b.
Distúrbios circulatórios	Angina	San Lin, 1994.
	Coágulos Sanguíneos	San Lin, 1994.
	Cólicas menstruais	San Lin, 1994.
Doenças Cardiovasculares	Prevenção de arritmia	Wongcharoen and Phrommintikul, 2009.
Doenças neurodegenerativas	Esclerose múltipla	Natarajan e Bright, 2002
	Mal de Parkinson	Zbarsky et al. 2005; Fuentes et al, 2010.
	Epilepsia	Sumanont al , 2006.
	Lesão cerebral	Ghoneim al, 2002.
	Neurodegeneração, associado à idade	Calabrese et, 2003.
	Esquizofrenia	Bishnoi al. 2008
	Encefalopatias espongiformes (Doença de Creutzfeld-Jakob)	Hafner-Bratkovic et al, 2008.
	dor neuropática	Sharma et al., 2006a.
	Depressão	Xu et al, 2005; Wang et al, 2008.
	Mal de Alzheimer	Lim et al, 2001.
Outras doenças	Colesterol	Asai e Miyazawa, 2001.
	Trombose	Srivastava et al, 1985.
	Plaquetas no sangue	Srivastava et al, 1995.
	Catarata	Awasthi et al, 1996.

2.5 ASPECTOS SOBRE A TRANSPIRAÇÃO HUMANA

A pele é o principal órgão do corpo humano de comunicação com o exterior (meio ambiente), que serve como proteção para o organismo. Além das funções de proteção, possui também a função de excretar materiais sebáceos e suor através da glândula sebácea e sudorípara e controlar a perda de fluidos, sais, hormônios e outros materiais endógenos; promover termoregulação do corpo através da evaporação de água pela glândula sudorípara (Lorenzetti, 2007).

A pele humana está constituída por três camadas em corte perpendicular: epiderme, derme e hipoderme (Figura 21):

A epiderme tem como função principal atuar como uma barreira protetora contra o ambiente externo, evitando a entrada de substâncias estranhas ao organismo, ao mesmo tempo retendo o conteúdo interno – principalmente a água, eletrólitos e nutrientes (Harris, 2003).

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme, contém quase todas as estruturas da pele. A área mais profunda está ocupada por uma rede densa de fibras entrelaçadas. Quase todas as fibras nessa área são compostas por colágeno, que dá resistência à pele. Tendo também fibras elásticas que a tornam distensível (isto é, capaz de retornar à forma anterior). Além dos elementos de tecido conectivo, a derme contém uma rede especializada de nervos e terminações nervosas para o processamento da informação sensitiva como pressão, tato e temperatura. Em vários níveis da derme, há fibras musculares, folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas e muitos vasos sanguíneos (Thibodeau e Patton, 2002)

É estimado que existam cerca de 2.380.000 glândulas sudoríparas por toda a superfície do corpo. Estas glândulas são divididas em dois tipos: écrinas e apócrinas. As glândulas do tipo écrinas são mais numerosas e sua função é de regular o equilíbrio térmico do organismo. São controladas pelo sistema nervoso simpático e sua origem é na derme ou hipoderme com a abertura da via do ducto na superfície da pele (Lorenzetti, 2007). A sudorese, ato de produzir e libertar suor, inicia quando a temperatura corporal central é superior a 37°C. A secreção das glândulas sudoríparas écrinas é basicamente uma solução hipotônica, que, além de água, contém sódio, cloreto, potássio, uréia. Esta secreção não provoca alteração de odor na pele (Harris, 2003).

2.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS MICROORGANISMOS EMPREGADOS NO ESTUDO: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* E *Salmonella tiphymurium*

Dentre os gêneros de microrganismos responsáveis por causarem infecções de pele e mucosas podem ser destacados *Staphylococcus* e *Candida*, bactérias gram-positivas (Lapinski, 2008).

O gênero *Staphylococcus* abrange cerca de 42 espécies diferentes, sendo 20 associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais (Koneman et al., 2001). Em patologias humanas, as principais espécies envolvidas são: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (Trabulsi et al., 2002).

O *Staphylococcus aureus* é uma espécie de bactéria que se apresenta como cocos Gram-positivos reunidos em cachos, são muito resistentes devido a sua relativa capacidade termo-resistente, de manter-se sob condições de alta pressão osmótica e poder permanecer viáveis por longos períodos em objetos secos; características que permitem ao *S. aureus* estar presente em qualquer tipo de ambiente humano (Tally e Barg, 2002; Tortora et al., 2000).

Estima-se que 25% da população humana sejam carreadores permanentes deste microrganismo. Uma vez instalado em seu hospedeiro, pode causar uma enorme variedade de sintomas clínicos, afetando a pele, pulmões, coração, sistema nervoso central, ossos e articulações, corrente sangüínea e trato gastrointestinal (Bachert et al., 2002; Zocche, 2005). O *Staphylococcus aureus* pode causar vários tipos de intoxicações, seja durante um processo infeccioso, como, por exemplo, a síndrome da pele escaldada, ou não, como nos casos da intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico. A intoxicação alimentar é provocada pela ingestão de toxinas formadas no alimento contaminado pelo microrganismo (Bachert et al., 2002; Zocche, 2005). O *S. aureus* também é o patógeno mais frequente no diagnóstico de furúnculos na pele (ANVISA, 2010), além de diagnóstico de erisipela que trata-se de uma infecção local profunda da derme (ANVISA, 2010).

Outra espécie clinicamente importante do gênero *Staphylococcus* é *S. epidermidis*. Ao contrário dos *S. aureus*, *S. epidermidis* não produz toxinas. Dessa maneira, não são capazes de causar envenenamento alimentar ou síndrome do choque tóxico. (Hennin; Wai; Ziebuhr, 2007; Levinson; Jawtz, 2005). Todavia, isto não significa que *S. epidermidis* não possa ser patogênico. Esta espécie tem muitos fatores de adesão e forma muito biofilme, podendo causar infecções em locais com prótese (Mamizuka e Pignatari, 2010). *S. epidermidis* também é um

dos responsáveis pela conjuntivite bacteriana normais, pois é o microorganismo mais frequentemente encontrado na conjuntiva de indivíduos (Nakano et al., 2002).

A *Escherichia coli* assume a forma de um bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Quando encontrada em água é um indicativo de contaminação fecal. Existem, enquanto parte da microbiota normal no intestino, em grandes números. Cada pessoa evacua em média, com as fezes, um trilhão de bactérias *E.coli* todos os dias. A doença é devida à disseminação, noutros órgãos, das estirpes intestinais normais; ou nos casos de enterite ou meningite neonatal à invasão do lúmen intestinal por estirpes diferentes daquelas normais no indivíduo. Cerca de 80% dos casos de infecção do trato urinário (ITU) em mulheres jovens é causada pela *E. coli* (Murray, 2004).

Salmonella é uma bactéria que causa doenças em humanos e animais, através do consumo e da ingestão de alimentos contaminados. As espécies desse gênero atravessam a camada epitelial intestinal, alcançam a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam. São fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando em resposta inflamatória, decorrente da hiperatividade do sistema reticuloendotelial (Shinohara et al., 2008)

A salmonelose infantil é uma doença nosocomial, na maioria das vezes, e o sorotipo dominante é *Salmonella typhimurium* que, aliás, é resistente à maioria dos antimicrobianos em uso terapêutico (Trabulsi e Alterthum, 2004; Shinohara et al., 2008).

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Algodão

O tecido de algodão foi doado pela empresa Coteminas. O tecido apresenta uma gramatura de $0,34 \pm 0,02 \text{ g/cm}^2$ e foi pré-alvejado. Não foi utilizado branqueamento óptico.

3.1.2 Enzima

A solução enzimática utilizada neste trabalho foi a novoprime®969, cedida pela empresa Novozymes. Para complementar os dados informados pela empresa, foi realizada uma caracterização mais detalhada do caldo enzimático. Esta enzima é composta praticamente por endocelulases e usada em processo de estonagem de tecido jeans (celulose tingida como corante índigo).

3.1.3 Corantes

Para primeiros ensaios de liberação controlada foram utilizados os corantes sintéticos: C.I. Vermelho Reativo 23, C.I. Vermelho Reativo 141, C.I. Azul Reativo 21.

A matéria-prima empregada no desenvolvimento do tecido com corante natural foi constituída de rizomas de *Curcuma longa* L., Zingiberaceae, *in natura*.

3.1.4 Reagentes químicos

Os principais reagentes químicos utilizados estão na tabela 2.

3.1.5 Outros materiais e equipamentos

Todos os equipamentos citados durante os procedimentos experimentais constam no anexo A

Tabela 2: Principais reagentes químicos utilizados nos procedimentos experimentais

Reagente	Fórmula Molecular	Marca
Acrilamida	C_3H_5NO	Biosolve
Albumina de soro bovino 96% (BSA)	-----	Sigma
Ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS)	$C_7H_4N_2O_7$	Sigma
Ácido fosfórico 85%	H_3PO_4	Carbo Erba
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	Nuclear
Ácido acético	CH_3COOH	Biotec
Ácido Clorídrico	HCl	Vetec
Acetato de sódio	CH_3COONa	Nuclear
Azul de coomassie G-250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7N_2$	Vetec
Azul de coomassie R-250	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7N_2$	Vetec
Azul de bromofenol (ABS)	$C_{19}H_9Br_4O_5S$	Amresco
Bis-acrilamida	$C_7H_{10}N_2O_2$	Biosolve
Carbonato de sódio	Na_2CO_3	Nuclear
Carboximetilcelulose 99,5% (CMC)	-----	CRQ
Cloreto de sódio	$NaCl$	Synth
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Biosolve
Etanol	C_2H_5OH	Nuclear
Fenol	C_6H_5OH	Synth
Fosfato de sódio	NaH_2PO_4	Nuclear
Glicina	$C_2H_5NO_2$	Vetec
Glicerol	$C_3H_5(OH)_3$	Amresco
Glicose (D+) anidra	$C_6H_{12}O_6$	Vetec
Glutaraldeído 25%	$C_5H_8O_2$	Vetec
Hidróxido de sódio	$NaOH$	Nuclear
β -mercaptoetanol	C_2H_6OS	Amresco
Metanol	CH_3OH	Vetec
Papel filtro Whatman nº1	-----	Whatman
Persulfato de amônio (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Amresco
Reativo de Folin 2N	-----	Merck
Sulfato de cobre	$CuSO_4$	Nuclear
Tartarato duplo de sódio e potássio	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	Vetec
N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	Vetec
Tris-hidroximetil aminometano (Tris-Base)	$C_4H_{11}NO_3$	Amresco
Uréia	$(NH_2)_2CO$	Vetec
Padrão de peso molecular	-----	Bio-Rad

3.2 PROCEDIMENTOS

3.2.1 Determinação de açúcares redutores totais.

A determinação de açúcares redutores totais foi realizada através da adaptação do método Muller (1959) e de acordo com as recomendações da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) (Ghose, 1986).

Este método baseia-se na reação entre o ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) e os açúcares redutores. A presença destes monossacarídeos reduz o DNS fornecendo um produto de cor amarelada (figura 25) que absorve em 540nm, possibilitando a obtenção da concentração de açúcar redutor através de uma curva de calibração.

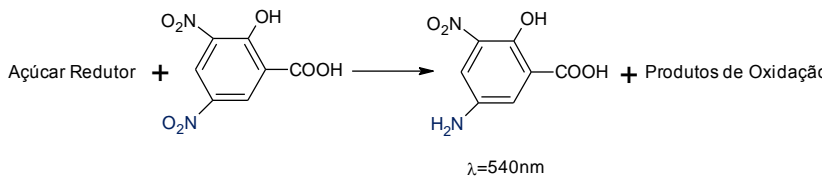


Figura 21: Reação de açúcares redutores com o ácido 3,5-dinitro-salicílico.
Fonte: Martins, 2005.

Para o preparo do reagente DNS foram preparadas as seguintes soluções: Solução A: 16g de hidróxido de sódio dissolvidos em um béquer contendo 200mL de água destilada; Solução B: 300g de tartarato de sódio e potássio dissolvido em um béquer contendo 300mL de água destilada; Solução C: 10g de ácido 3,5-dinitrosalicílico dissolvido em um béquer contendo 300mL de água;

Primeiramente foi misturada a solução A em B e agitado até a completa dissolução. Com o auxílio de agitação e de forma lenta foi adicionada a solução C. Após a dissolução completa dos reagentes, o volume foi completado para 1L com água destilada. O recipiente foi armazenado a temperatura ambiente e isolado da luz.

Este método foi utilizado para a determinação da atividade da enzima celulase tanto do caldo como na enzima imobilizada no tecido durante os ensaios de liberação controla. Para cada ensaio uma nova curva de calibração usando glicose como padrão foi construída e será detalhada a seguir:

- *Curva de calibração para determinação da atividade celulásica (item 3.2.2.4):*

A curva foi construída através de concentrações que variaram de 0 a 1mg/mL de glicose em tampão acetato 0,05M pH 5,5. À 1mL de solução de glicose foram adicionados 1,5mL de DNS em um tubo de ensaio. Após 5min a 100°C o tubo foi resfriado e a amostra foi diluída para 12mL. A absorbância foi lida em 540nm utilizando um espectofotômetro V-1200 marca pró-análise mostrado na figura A1 do anexo A. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Outra curva utilizando concentrações de 0 a 0,05mg/mL de glicose foi construída utilizando tampão suor ácido pH 5,5. O procedimento realizado foi o mesmo que o anterior.

A preparação da solução de suor ácido consta no item 3.2.6 deste trabalho.

- *Curva de calibração para determinação da atividade da enzima imobilizada no tecido (item 3.2.6):*

A curva foi construída através de concentrações que variaram de 0 a 0,5mg/mL de glicose em tampão suor pH 5,5. À 500 µL de solução de glicose foram adicionados 1,5mL de DNS em um tubo de ensaio. Após 5min a 100°C o tubo foi resfriado e a amostra foi diluída para 7mL. A absorbância foi lida em 540nm utilizando um espectofotômetro V-1200 marca pró-análise, mostrado na figura A1 do anexo A. Este procedimento foi realizado em triplicata.

A preparação da solução de suor ácido consta no item 3.2.6 deste trabalho.

3.2.2 Caracterização parcial da enzima

A caracterização parcial da enzima celulase comercializada como novoprime®969 foi realizada através da determinação de proteína, de sua atividade e do seu perfil protéico usando a eletroforese como método.

3.2.2.1 Determinação da concentração de proteína

3.2.2.1.1 Método de Bradford

O método de Bradford, 1976 é uma técnica que utiliza o corante Azul de Coomassie G-250 (figura 26) para a determinação de proteínas totais. Este método baseia-se na interação entre as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente 595 nm (Zaia et al.,1998).

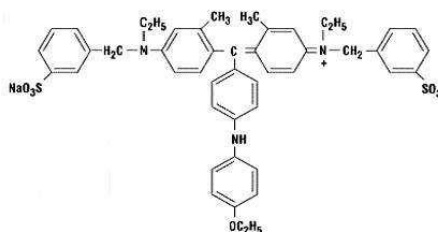


Figura 22: Estrutura do corante Coomassie Brilliant Blue BG-250.

Fonte: Martins, 2005.

Para o preparo da solução, 25mg do corante Azul de Coomassie G-250 foram dissolvidos em 12,5 mL de etanol 95%. Adicionou-se 25 mL de ácido fosfórico 85% e a solução foi diluída para 250 mL.

Este método foi utilizado para a determinação de proteínas do caldo enzimático bem como nos ensaios de liberação controlada para a observação da liberação de enzima. Para cada tipo de ensaio um tipo de procedimento e uma nova curva de calibração foi construída, sendo que as soluções do corante Coomassie Blue G-250 foram feitas no mesmo dia de uso. A seguir estão descritos o procedimento de acordo com o ensaio realizado:

- *Determinação de proteína no caldo enzimático.*

A concentração de proteínas totais foi determinada através de uma curva de calibração usando soluções de 0 a 0,3 mg/mL de albumina soro bovino (BSA) como proteína padrão.

Para a análise, a 100µL de amostra foram adicionados 3 mL da solução corante e aguardou-se exatamente 5min. Logo em seguida a absorbância foi lida num espectrofotômetro V-1200 marca pró-análise mostrado na figura 1 do anexo 1. Este procedimento foi realizado em triplicata.

O mesmo procedimento foi realizado com amostras contendo a enzima (do caldo) em várias diluições, onde para cada diluição realizada foram feitas determinações em triplicata.

- *Determinação de proteína durante a imobilização enzimática (item 3.2.5)*

A concentração de proteínas totais foi determinada através de uma curva de calibração usando soluções de 0 a 0,1 mg/mL de albumina soro bovino (BSA) como proteína padrão.

Para a análise, à 100µL de amostra foram adicionados 3 mL da solução corante e aguardou-se exatamente 5min. Logo em seguida a absorbância foi lida num espectrofotômetro V-1200 marca pró-análise mostrado na figura 1 do anexo 1.

- *Determinação de proteína durante a liberação controlada. (item 3.2.6)*

A concentração de proteínas totais foi determinada através de uma curva de calibração usando soluções de 0 a 7µg/mL de albumina soro bovino (BSA) como proteína padrão.

Para a análise, a 300µL de amostra foram adicionados 3 mL da solução corante e aguardou-se exatamente 5min. Logo em seguida a absorbância foi lida num espectrofotômetro V-1200 marca pró-análise mostrado na figura 1 do anexo 1. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Para a determinação de proteínas durante a liberação controlada foi utilizando o mesmo procedimento, apenas realizando-o em duplicata.

3.2.2.1.2 Método de Lowry

A determinação de proteínas pelo método de Lowry foi realizada segundo Melo (2007) e Lowry (1951).

Neste método o reagente Folin-Ciocalteu (mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico), sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

Para o método foram preparadas as seguintes soluções: Solução A: 2 g de Na_2CO_3 + 0,02 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100mL de NaOH 0,1 M. Solução B: 0,5 g de CuSO_4 + 2 gotas de H_2SO_4 concentrado em 100mL de água destilada. Solução AB: 50 mL da solução A + 1 mL do solução B (preparada imediatamente antes da dosagem). Reativo de Folin: Solução 1 N, conservar ao abrigo da luz.

A 100 μL de amostra foram adicionados 1mL de NaOH 0,1 M e 3mL de solução AB. O tubo de ensaio permaneceu por 5 minutos em um banho de ultra-som a 25°C. Adicionou-se 300 μL de reativo de Folin e a amostra reagiu por exatamente 30min, sendo que os primeiros 5 minutos o tubo permaneceu novamente em banho de ultra-som.

A determinação de proteína do caldo enzimático pelo método de lowry foi feita usando as mesmas soluções de enzimas utilizadas no método de Bradford para fins comparativos entre as metodologias.

Uma curva de calibração usando BSA nas concentrações de 0 a 0,5 mg/mL foi construída.

3.2.2.2 Análise dos perfis protéicos por eletroforese SDS-PAGE

Nesta técnica um gel é preparado e através de uma corrente elétrica (com auxílio de uma solução tampão) as proteínas migram entre o polímero com diferentes velocidades, pois apresentam diferentes pesos moleculares.

Este gel consiste no produto da polimerização da acrilamida e da N,N metileno-bis acrilamida. A formação do gel ocorre por um mecanismo de polimerização vinílica, catalisada pelo persulfato de amônio. Os dois catalisadores participam da geração de radicais livres, que são estabilizados por uma amina terciária, TEMED. Os radicais livres formados reagem com a acrilamida, ativando-a. A acrilamida ativada reage com outras moléculas de acrilamida formando ligações cruzadas intercadeiais, produzindo uma longa cadeia linear do polímero. A participação da bis-acrilamida atua formando ligações cruzadas entre as cadeias lineares, originando uma rede que resulta na formação do gel (Bracht, 2003; Sanada, 2009).

Para este procedimento foi necessária a preparação da amostra enzimática através de um tampão que continha o dodecilsulfato de sódio (SDS). Este reagente se liga às porções hidrofóbicas das proteínas, rompendo suas dobras e permitindo que elas existam em conformação estendida estável. Como resultado, o tamanho do complexo proteína-SDS é proporcional ao seu peso molecular (Bracht, 2003; Sanada, 2009).

Uma alíquota de 1mL de enzima com concentração de 50mg/mL foi diluída em tampão de amostra (2,5mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 5mL de glicerol 50%, 5mL de SDS 10%, 2,5mL de azul de bromofenol 0,05% diluí com água miliQ para 25mL), sob condições redutoras, de acordo com Laemmli (1970). Para condições redutoras, foi acrescentado ao tampão de amostra 0,5 mL de β -mercaptoetanol 5% (β -ME 5%) e as amostras foram aquecidas por 5 minutos a 100 °C.

Foram preparados dois géis de bis-acrilamida/ acrilamida, sendo o primeiro (acima) o gel de concentração que tinha como finalidade concentrar a amostra e o padrão na mesma linha e 12,5% (gel de migração), onde ocorreu a separação. A tabela 3 mostra as concentrações e reagentes utilizados para o preparo dos géis:

Tabela 3: Reagentes para o preparo de um gel de Eletroforese de (20x20) cm².

GEL POLIACRILAMIDA	CONCENTRAÇÃO	MIGRAÇÃO
	5%	12,5%
Acrilamida/Bis-Acrilamida (30%T,3%C)	1660	10500
Solução Tampão Tris HCl 1 M, pH 6,8	2500	-
Solução Tampão Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	-	6250
SDS 10%	2000	2500
Água MiliQ	3720	5750
TEMED	20	25
APS 10%	100	125
VOLUME TOTAL (μL)	10000	25150

A eletroforese foi realizada em sistema vertical 20 x 20 cm (anexo A, figura A6) a 200V (para o gel de concentração) e 400V (para o gel de migração), utilizado uma tampão de corrida com pH 8,3. As amostras foram colocadas com o volume de 15 μ L em cada poço. As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular em perfil eletroforético foram a miosina (196,143 kDa), β -galactosidase (131,064 kDa), BSA (90,555 kDa), anidrase carbônica (42,076 kDa) e inibidor de tripsina de soja (31,931 kDa) (Bio-Rad, marcador pré-corado). Após a eletroforese, as bandas protéicas foram coradas com azul de Coomassie R-250 1%, 45% de metanol, 1% ácido acético e 45% de água miliQ. A solução descorante utilizada foi preparada com 45% de metanol, 10% de ácido acético e 45% de água miliQ.

3.2.2.3 Determinação da dosagem de atividade enzimática

O perfil catalítico da enzima celulase foi avaliado segundo as atividades celulásicas total, endoglucanásica, exoglucanásica.

Para todos os ensaios uma unidade (U) de atividade de celulase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1mmol de grupos redutores, medidos como glicose, por minuto, nas condições de reação utilizadas.

Em todas as determinações foram utilizados para o cálculo de atividade enzimática a seguinte equação:

$$U / mL_{EnzConc} = \left(\frac{C(mg/mL)}{MM_{glicose}(mg/mol) \cdot T(min) \cdot F_{mmol}} \right) \cdot \left(\frac{V_{TOTAL}(mL) \cdot F_{DILenz}}{V_{ENZdiluida}(mL)} \right)$$

onde,

$U / mL_{EnzConc}$ = mmol de glicose liberada por minuto por mL de enzima concentrada

C = concentração de glicose em mg/mL liberada pela enzima diluída

$MM_{glicose}$ = massa molar da glicose

$V_{ENZdiluida}$ = volume usado de enzima durante os ensaios de atividade

V_{TOTAL} = Volume total usado nos ensaios de atividade

F_{DILenz} = Fator de diluição da enzima usado nos ensaios de atividade

3.2.2.3.1 Celulásica total

A determinação da atividade celulásica total foi realizada utilizando como substrato o papel de filtro Whatman nº 1, segundo metodologia adaptada de Ghose (1986).

Para este estudo, em a tubo de ensaio foram adicionados 5mL de tampão acetato 0,05M (no pH desejado) e 100µL de enzima diluída. O tubo foi incubado a fim de estabilizar a temperatura. Posteriormente 40mg de papel de filtro Whatman nº 1 foi colocado no tubo de ensaio sob agitação de 60rpm e após exatamente 5min, a reação foi interrompida com 1,5mL de DNS e posta para ferver por 5min. Logo após a amostra foi resfriada e diluída para um volume total de 12,5mL.

O procedimento acima foi realizado substituindo o volume da enzima por solução tampão e esta solução foi usada como branco do espectrofotômetro, e também sem a presença do papel filtro para que a absorbância da enzima pudesse ser descontada dos resultados. A absorbância foi lida em 540nm usando um espectofotômetro V-1200 marca pró-análise mostrado na figura 1 do anexo 1.

O tempo de 5 minutos foi determinado através de um estudo com o mesmo procedimento acima exceto o tempo de reação que foi variado, a fim de se obter nas condições do ensaio, o tempo em que a atividade permanece sob velocidade máxima. Tempo este que foi utilizado em todos os ensaios de atividade enzimática. Para cada tempo de reação estudado foram repetidos os procedimentos 5 vezes com a finalidade de se obter segurança nos resultados obtidos.

O papel de filtro Whatman nº1 antes de ser adicionado ao tubo foi dobrado ao meio a fim de proporcionar total contato com a solução.

A enzima utilizada foi diluída em tampão acetato 0,05M (de acordo com o pH de reação) com um fator de diluição de 5 vezes.

Através deste ensaio foi possível determinar o pH e a temperatura ótimos de atividade da enzima celulase. Para isto, foram variados pH de 5 a 6 e a temperatura de 25 a 60°C.

Para meio de comparação a atividade total foi determinada na presença de tampão suor pH 5,5 nas temperaturas de 25, 37 e 55°C.

A concentração de açúcar redutor foi determinada através da curva de calibração descrita no item 3.2.1.

3.2.2.3.2 *Endoglucanásica*

A determinação da atividade endoglucanásica foi realizada utilizando como substrato a carboximetil celulose (CMC), segundo metodologia adaptada de Ghose (1986).

Em um tubo de ensaio foram adicionados 4mL de tampão pH 5,5 e 100µL de enzima diluída. A temperatura do tubo foi estabilizada. Posteriormente 1mL de CMC 1mg/mL foi adicionado ao tubo de ensaio sob agitação de 60rpm e após exatamente 5min, a reação foi interrompida com 1,5mL de DNS e posta para ferver por 5min. Logo após a amostra foi resfriada e diluída para um volume total de 12,5mL.

A absorbância foi lida em 540nm usando um espectofotômetro V-1200 marca pró-análise mostrado na figura 1 do anexo 1. O branco utilizado foi feito com o mesmo procedimento, porém, com a substituição da enzima por tampão. Entretanto, também foi avaliado o valor referente a absorção da enzima e este descontado dos resultados.

Para este estudo foram usados tampão acetato 0,05M e tampão suor, ambos com o mesmo pH e nas temperaturas de 25, 37 e 55°C. A enzima utilizada foi diluída cinco vezes. A concentração de açúcar redutor foi determinada através da curva de calibração descrita no item 3.2.1.

3.2.2.3.3 Exoglucanásica

A determinação da atividade exoglucanásica foi realizada utilizando como substrato Avicel® (celulose cristalina), segundo metodologia adaptada de Ghose (1986).

Em um tubo de ensaio foram adicionados 5mL de Avicel 1% em tampão pH 5,5. A temperatura foi estabilizada e adicionou-se 100µL de enzima diluída em tampão. Sob agitação de 60rpm e após exatamente 5min, a reação foi interrompida com 1,5mL de DNS e posta para ferver por 5min. Logo após a amostra foi resfriada e diluída para um volume total de 12,5mL. O procedimento foi realizado usando tampão acetato e tampão suor.

A absorbância foi lida em 540nm usando um espectofotômetro V-1200 marca pró-análise mostrado na figura 1 do anexo 1. O branco utilizado foi feito com o mesmo procedimento, porém, com a substituição da enzima por tampão. Entretanto, também foi avaliado o valor referente a absorção da enzima e este descontado dos resultados.

Para este estudo foram usados tampão acetato 0,05M e tampão suor, ambos com o mesmo pH e nas temperaturas de 25, 37 e 55°C. A enzima utilizada foi diluída cinco vezes. A concentração de açúcar redutor foi determinada através da curva de calibração descrita no item 3.2.1.

3.2.3 Tingimento de Tecido de Algodão Felpudo com Corantes Modelo

Com a finalidade de avaliar o comportamento tanto do processo de imobilização quanto da liberação controlada, tecidos de algodão felpudo foram tingidos com corantes reativos, que neste estudo, foram chamados de compostos modelo, pois suas estruturas são conhecidas e estes, não sofrem degradação tão facilmente quanto os corantes naturais, podendo ser medidos mais facilmente. As estruturas químicas dos corantes reativos são mostradas nas figuras 27, 28 e 29:

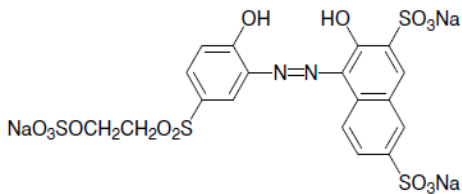


Figura 23: Estrutura química do corante Remazol Vermelho 3B, classificado no Colour Index como C.I. Vermelho Reativo 23 e denominado neste trabalho como “Vermelho 23”.

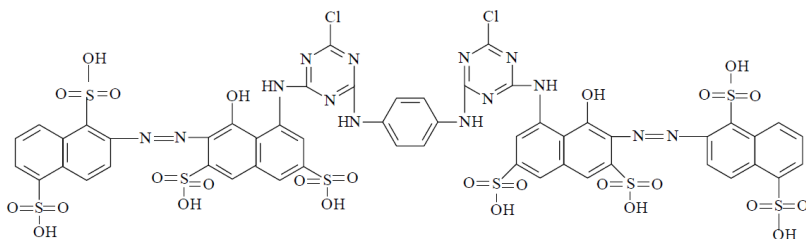


Figura 24: Estrutura química do corante Remazol Vermelho HE7B, classificado no Colour Index como C.I. Vermelho Reativo 141 e denominado neste trabalho como “Vermelho 141”.

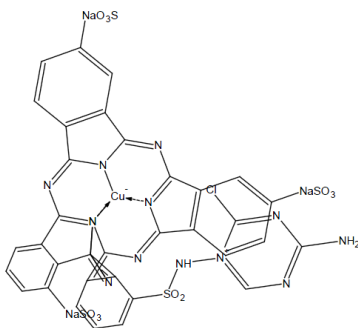


Figura 25: Estrutura química do corante Remazol Turquesa G, classificado no Colour Index como C.I. Azul Reativo 21 e denominado neste trabalho como “Azul 141”.

Para cada corante foi avaliado seu comportamento através de uma varredura de 190 a 1100 nm a fim de obter o λ_{max} de cada corante. Após a identificação dos picos de absorbância foram construídas curvas de calibração através de soluções de 0 a 0,04mg/mL para os corantes reativos vermelhos e de 0 a 0,01mg/mL para o corante azul turquesa.

Para o processo de tingimento foi realizado no equipamento Jigger (figura A2 do anexo A) e utilizou-se uma relação de banho de 1:25 e amostras das soluções iniciais e final foram retiradas e lidas nos seus respectivos comprimentos de onda usando espectrofotômetro descrito na figura A3 do anexo A. O procedimento para todos os tingimentos está detalhado na figura 30:

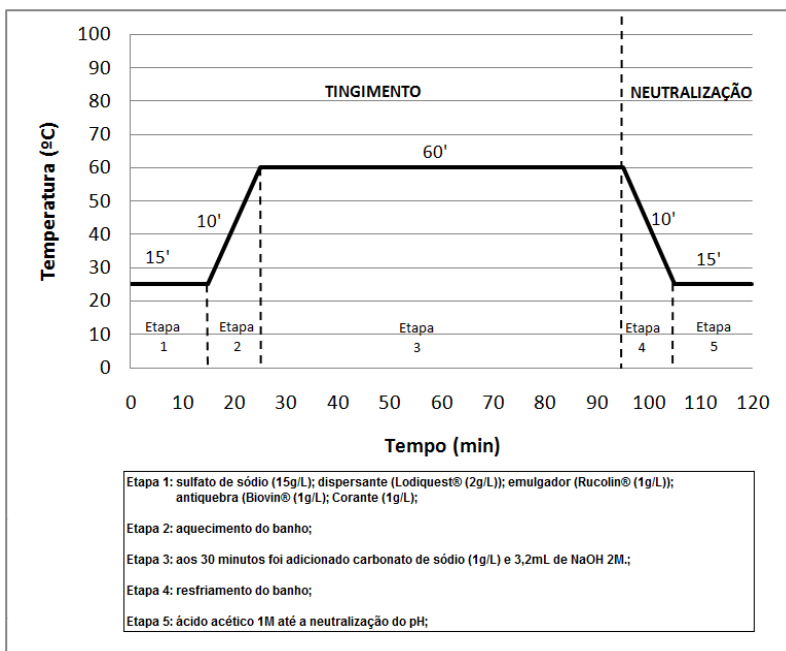


Figura 26: Etapas do processo de tingimento do tecido de algodão utilizando os corantes reativos C.I. Reactive Red 23, C.I. Reactive Red 141 e C.I. Reactive Blue 21.

Após todas estas etapas os tecidos tingidos foram lavados em água corrente e secos a 60°C utilizando o equipamento rama mostrada no anexo A na figura A4.

3.2.4 Primeira etapa de imobilização: reticulação da celulose com glutaraldeído

A primeira etapa do processo de imobilização foi reagir a celulose com o agente reticulante glutaraldeído. Nesta etapa foram realizados testes com o objetivo de obter a concentração de glutaraldeído que reage com uma determinada quantidade de tecido (2,5g). Para tanto também foi avaliado a influência da temperatura e a presença de corantes na superfície da celulose.

Em todos os estudos onde se fez necessário determinar a concentração de glutaraldeído (GLU) utilizou-se a metodologia descrita por Boratynski e Zal, 1990. Neste método foram retirados 200µL de amostra, acrescentou-se 40µL de fenol 20% em etanol e 750µL de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se por 2 minutos e acrescentou-se 3mL de água destilada. A absorbância foi lida em 482nm.

A concentração de glutaraldeído foi determinada através de uma curva de calibração usando soluções de 0 a 0,08mg/mL de glutaraldeído.

Os procedimentos para todos os estudos da primeira etapa de imobilização são descritos nos itens a seguir:

3.2.4.1 Efeito da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído

A fim de avaliar a influência da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído (GLU) e na primeira etapa de imobilização, 100 mL de soluções 0,08mg/mL de GLU em tampão acetato 0,05M pH 5,5 foram acondicionadas (sob agitação de 110 rpm) a 10, 25 e 35°C, onde amostras foram retiradas no início e após 40 minutos para verificar a estabilidade da solução.

Após esta etapa, foram adicionados 2,5g de tecido de algodão sem nenhum tratamento e a concentração de glutaraldeído foi determinada em determinados intervalos de tempo.

3.2.4.2 Otimização da concentração de glutaraldeído que reage com a celulose

Neste ensaio, 100mL de soluções de GLU em tampão acetato 0,05M, pH 5,5, permaneceram sob agitação por 40 min a 25°C. Após este tempo, amostras de 2,5g de tecido branco sem tratamento foram adicionadas em cada solução e determinada a concentração de GLU que reage com esta quantidade de tecido por 60 min.

3.2.4.3 Efeito da presença dos corantes modelo durante a reticulação da celulose com glutaraldeído

Dos ensaios realizados no item 3.3.4.2, duas concentrações foram escolhidas e avaliou-se a influência da presença dos corantes reativos na reação do GLU com a celulose. Para isto, 2,5g de tecido tingido com corante reativo foram adicionados a 100mL de GLU em tampão acetato 0,05M pH 5,5 na temperatura ambiente por 60 min. A concentração de glutaraldeído foi determinada em diferentes intervalos de tempo.

3.2.5 Segunda etapa de imobilização: otimização da concentração de enzima.

Após a reticulação da celulose com o glutaraldeído foi adicionado um volume de enzima para que ela pudesse reagir com o glutaraldeído e completasse o processo de imobilização enzimática.

Duas concentrações de glutaraldeído foram usadas neste estudo. A primeira 0,04 mg/mL de glutaraldeído em tampão acetato 0,05M pH 5,5 permaneceu sob agitação por 40 minutos, e logo após, a amostra de tecido sem tratamento (2,5g) foi adicionada permanecendo por 60 minutos a 75 de rpm. Após o termino da reação, a amostra foi lavada com água destilada a temperatura ambiente para retirar o glutaraldeído que não reagiu com a celulose. À temperatura de 0°C, 100mL de enzima em tampão acetato 0,05M pH 5,5 foi acondicionada até a estabilização da temperatura. Logo após, a amostra de tecido tratado foi adicionada a solução de enzima e procedeu-se a etapa final de imobilização por 60 minutos. Durante este processo foi determinada a concentração de enzima que reagiu com o glutaraldeído em diferentes intervalos de tempo através do método de Bradford citado no item 3.3.2.1. A amostra foi lavada com água destilada gelada e permaneceu a 4°C por 8hs e logo em seguida foram secadas a 25°C em uma estufa (figura A5 do anexo A) e armazenadas em dessecador. Este procedimento foi realizado com diferentes concentrações de enzima. A segunda concentração de glutaraldeído estudada foi 0,03 mg/mL e procedeu-se da mesma maneira que o procedimento anterior.

3.2.6 Liberação controlada dos corantes sintéticos

Tecidos sem tratamento e tingidos com os corantes reativos foram imobilizados de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.5 usando as concentrações de enzima que reagiram completamente com as concentrações de glutaraldeído.

O procedimento de liberação controlada foi realizado com soluções de 100mL em tampão que imita o suor pH 5,5 a 37°C sob 60 rpm. A Solução de suor foi feita com 2,7g/L de cloreto de sódio e 0,75g/L de uréia, onde o pH foi ajustado para 5,5 com ácido acético 0,01M (Quadros, 2005; ISO 105 – E – 04).

A solução de suor ácido foi acondicionada a 37°C até a total estabilização da temperatura em erlenmeyer de 100mL. Após esta etapa a amostra de tecido imobilizada foi adicionada a solução e foi determinada a concentração de corante, de proteína e de açúcar redutor liberada durante 60 minutos.

A concentração de corante foi lida através de uma curva de calibração das soluções de corantes em tampão suor nos seus respectivos λ_{max} .

A concentração de proteína foi determinada através do método de Bradford (1976) descrita no item (3.2.2.1.1).

A determinação de açúcar redutor foi realizada segundo o método utilizando o reagente DNS descrito no item 3.2.1.

3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Ensaios de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizados em equipamento JEOL JSM-6390LV (anexo A, figura A6), disponível no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Esta técnica é fundamentada na interação de um feixe eletrônico primário incidente (gerado por um canhão de elétrons) com a amostra e foi utilizada para a caracterização morfológica dos tecidos de celulose.

As amostras foram cortadas em formato quadrangular de aproximadamente 0,5mm² e dispostas sobre uma fita de carbono, logo após foram recobertas com uma fina camada de ouro, conforme procedimento padrão.

3.2.8 Ensaios com o corante natural cúrcuma

3.2.8.1 Tingimento do tecido de algodão felpudo com cúrcuma

A extração dos corantes foi realizada através de rizomas de *Curcuma longa* L., Zingiberaceae, *in natura* (colhidos recentemente) (figura 31). Para isto, os rizomas foram triturados em um liquidificador convencional numa concentração de 40g/L em solução de 50% de etanol. Esta mistura permaneceu em repouso por 24hs. Após este

procedimento o extrato foi obtido através de uma filtração a vácuo usando papel filtro convencional.



Figura 27: Rizoma de Cúrcuma Longa L..

O pico máximo de absorção foi determinado através de uma varredura no espectrofotômetro descrito na figura A3 do anexo A.

Para o tingimento foram usados 45g de tecido de algodão. O tingimento foi realizado a 60°C por 90 minutos com uma concentração de 50 mL de extrato para 2 litros de água. O sal (NaCl) foi adicionado aos 20 minutos de tingimento com uma concentração de 15g/L.

Foram lidas as absorbâncias iniciais e após o término do tingimento. O tecido foi lavado com água em abundância e seco a 40°C no equipamento rama (figura A4 do anexo A).

3.2.8.2 Imobilização do tecido tingido com corante natural

A primeira etapa do processo de imobilização foi reagir a celulose com o agente reticulante glutaraldeído. Neste procedimento, 0,04 mg/mL de glutaraldeído em tampão acetato 0,05M pH 5,5 permaneceu sob agitação por 40 minutos, e logo após, a amostra de tecido tingido com cúrcuma (2,5g) foi adicionada permanecendo por 60 minutos a 75 rpm. Após o término da reação, a amostra foi lavada com água destilada a temperatura ambiente para retirar o glutaraldeído que não reagiu com a celulose. À temperatura de 0°C, 100mL de enzima em tampão acetato 0,05M pH 5,5 foi acondicionada até a estabilização da temperatura. Logo após, a amostra de tecido tratado foi adicionada a solução de enzima e procedeu-se a etapa final de imobilização por 60 minutos. A amostra foi lavada com água destilada gelada e permaneceu a 4°C por 8hs e logo em seguida foram secadas a 25°C em uma estufa (figura A5 do anexo A) e armazenadas em dessecador. Uma amostra sofreu apenas a primeira etapa do procedimento para fins comparativos. A concentração de glutaraldeído foi determinada através de uma curva de calibração usando soluções de 0 a 0,3% de glutaraldeído.

3.2.8.3 Avaliação da liberação controlada do corante natural

As amostras de tecido sem tratamento, com apenas glutaraldeído e com a imobilização completa sofreram o processo de liberação controlada.

O procedimento de liberação controlada foi realizado com soluções de 100 mL em tampão que imita o suor pH 5,5 a 37°C sob 60 rpm. A Solução de suor foi feita com 2,7g/L de cloreto de sódio e 0,75g/L de uréia, onde o pH foi ajustado para 5,5 com ácido acético 0,01M.

A solução de suor ácido foi acondicionada a 37°C até a total estabilização da temperatura num erlenmeyer de 100 mL. Após esta etapa a amostra de tecido imobilizada foi adicionada a solução e foi determinada a concentração de corante, de proteína e de açúcar redutor liberada durante 60 minutos. A concentração de corante foi lida através de uma curva de calibração de uma padrão de cúrcuma. A concentração de proteína foi determinada através do método de Bradford (1976) descrita no item (3.2.2.1.1). A determinação de açúcar redutor foi realizada segundo o método utilizando o reagente DNS descrito no item 3.2.1.

3.2.8.4 Microscopia eletrônica de varredura do tecido tingido com cúrcuma

A microscopia eletrônica dos tecidos tingidos com a cúrcuma e seus tratamentos foi obtida com o procedimento descrito no item 3.2.7.

3.2.8.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos tecidos tingidos com corante natural

A avaliação da atividade antimicrobiana dos tecidos tingidos com cúrcuma foi realizada com cepas liofilizadas de bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e Gram-negativas - *Escherichia coli* e *Salmonella tiphymurium*. Os ensaios foram realizados pelo Laboratório de Análise de Alimentos – NUMIC do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – CAL da Universidade Federal de Santa Catarina.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO DA ENZIMA POR ELETROFORESE SDS-PAGE

Para a determinação da massa molecular dos constituintes do caldo enzimático comercializado como novoprime®969 foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para que se tivesse uma melhor resolução da banda formada no gel, foi necessária a determinação de proteínas totais, de forma que a solução de amostra preparada obtivesse uma concentração de 50mg/mL de proteína. Para este procedimento foram utilizados os métodos de métodos de Lowry (1951) e Bradford (1976), que são comumente utilizados na literatura para a determinação de proteína (tabela 4).

Tabela 4: Resultados da determinação da concentração de proteína do caldo enzimático da enzima novoprime®969.

	Método de Lowry	Método de Bradford
Concentração de proteína (mg/mL)	165,8±2,3	62,1±3,6

É possível observar através da tabela 4 uma grande divergência entre os valores obtidos. A literatura cita que a presença de açúcares pode interferir nos resultados do método de Lowry, já que estes reagem com o reativo de Folin proporcionando um resultado falso positivo (Zaia et al., 1998; Fountoulakis, et al., 1992; Xu et al., 1994). Para avaliar esta interferência foi quantificada a concentração de açúcares redutores totais no caldo enzimático obtendo-se um valor positivo de ART de 85,5±1,3mg/mL. Por este motivo, optou-se pelo método de Bradford nas demais quantificações de proteínas, visto que no processo de liberação controlada há uma quantidade crescente de açúcares em solução.

O perfil eletroforético em SDS-PAGE do caldo enzimático novoprime®969 é mostrado na figura 32 e pode-se observar a presença de quatro massas moleculares distintas. Estas bandas podem estar

relacionadas aos tipos de enzimas celulases citados no item 2.3. Porém, conforme a tabela 1 é possível observar certa divergência entre os diferentes tipos de celulases e suas massas moleculares encontrados por diferentes autores. Entretanto, sabe-se que a enzima novoprime®969 tem sua composição composta principalmente por endoglucanases (Kim et al, 2011), podendo-se deduzir que a enzima com massa molecular de cerca de 85kDa trata-se de uma endocelulase. Só serão possíveis de identificadas as demais enzimas através da confirmação dos diferentes tipos de atividades enzimáticas que serão discutidos no item 4.2.

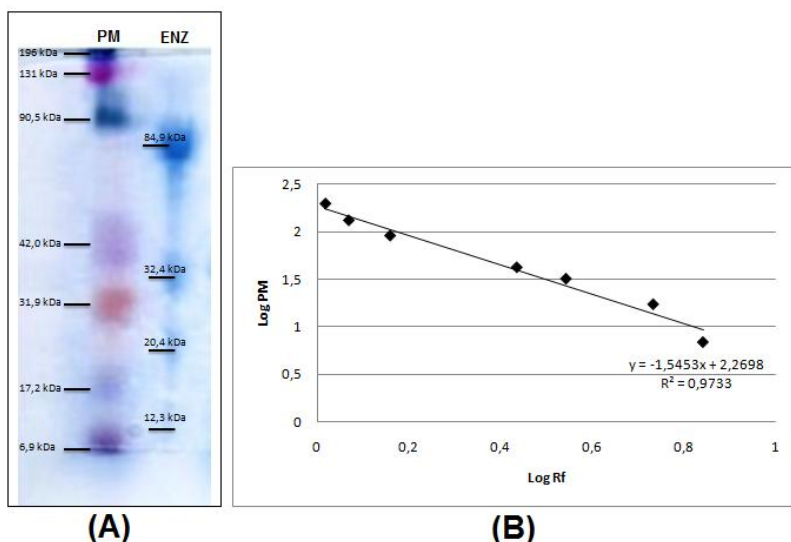


Figura 28: (A) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5 % (β-ME 5%) da enzima novoprime®969 (ENZ), comparada com marcadores de peso molecular (PM). (B) Curva de regressão linear utilizada para estimar o peso molecular dos componentes da enzima novoprime®969.

4.2 DOSAGENS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Como citado no item 2.3, na atividade enzimática a concentração de produtos aumenta linearmente num dado intervalo de tempo, isto ocorre somente quando a concentração do substrato está extremamente alta e, portanto tem-se a velocidade máxima. Assim seu sítio ativo neste intervalo de tempo estará sempre ocupado por moléculas de produto ou

de substrato. Deste modo, um estudo foi realizado determinando a concentração de açúcares redutores totais (ART) formada com o tempo, utilizando como substrato o papel filtro Whatman nº1, que é constituído por fibras de celulose com estrutura complexa e necessita para sua hidrólise total um sistema celulósico completo (atividade total). O objetivo deste ensaio foi determinar o intervalo de velocidade máxima e, portanto de atividade máxima nas condições de trabalho. Como mostra o gráfico 1, o intervalo de linearidade do gráfico ficou entre 1 e 8 minutos, sendo o tempo 5 minutos o escolhido para os demais ensaios de atividade.

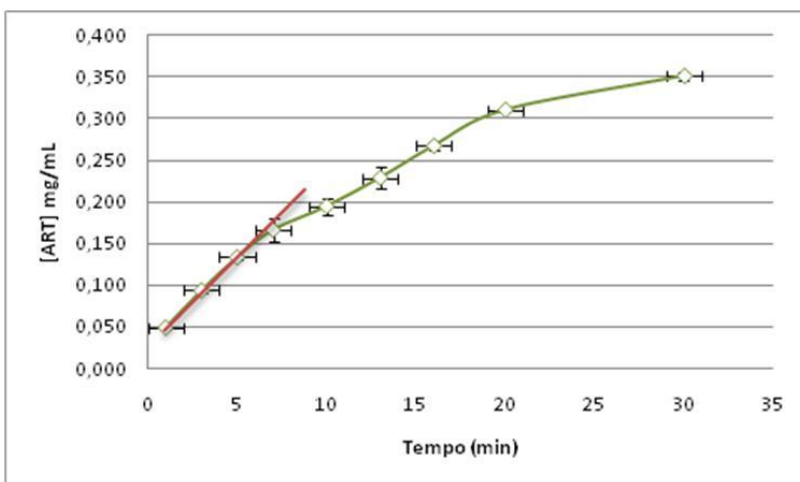


Gráfico 1: Determinação do intervalo de tempo de velocidade máxima da atividade da enzima novoprime®969 sobre o papel de filtro Whatman nº1, em tampão acetato 0,05M e pH 5,5 a 55°C. No gráfico é possível observar a variação da concentração de açúcares redutores totais (ART) formada com o tempo.

Como discutido também no item 2.3, cada enzima apresenta uma faixa de pH e temperatura ótimos. Para determinar estes valores foi utilizando também o papel de filtro Whatman nº1. Nestes ensaios foram realizados variações de pH de 5 a 6 e temperaturas que variaram de 25 a 60°C. A temperatura de 25°C foi escolhida, pois a enzima após ser imobilizada no tecido foi seca e armazenada à temperatura ambiente. Já que o objetivo do trabalho é desenvolver um processo de liberação

controlada através do suor da pele, a temperatura de 37°C foi escolhida em virtude de se tratar da temperatura na qual o corpo humano inicia o processo de transpiração. Posteriormente, foram variadas as temperaturas de 45 a 60°C, pois as celulasas geralmente apresentam temperaturas ótimas próximas a 50°C (Castro e Pereira, 2010).

Nos ensaios de atividade, uma unidade (U) de atividade celulasas foi definida como a quantidade de enzima que libera 1mmol de glicose por minuto de reação. Assim, pelo gráfico 2 observa-se que a temperatura e pH ótimos foram 55°C e 5,5, respectivamente. Coincidindo com as faixas de pH (4,5-5,5) e temperaturas (50 – 60°C) citadas pela ficha de informação técnica disponibilizada pela empresa novozymes (Novozymes, 2011).

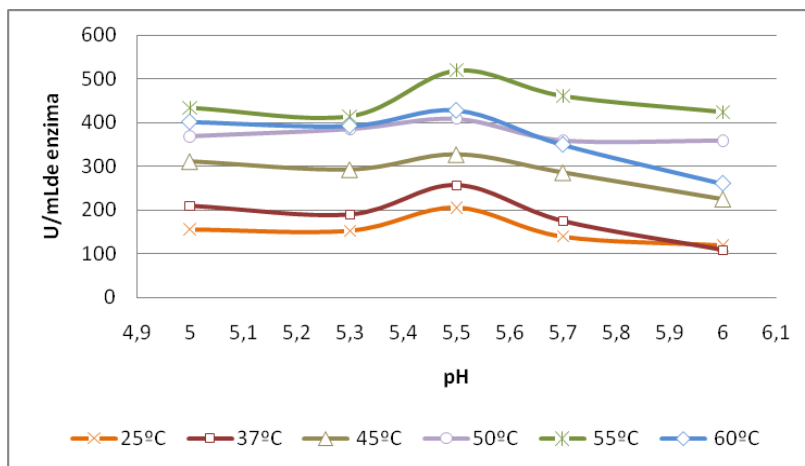


Gráfico 2: Variação da atividade enzimática total da enzima novoprime®969 em diferentes pH e temperaturas.

A escolha do tampão acetato para determinar as atividades se deve ao fato de que a solução que imita o suor humano utilizada nos ensaios de liberação controlada contém sódio e ácido acético (item 3.2.6), e este tampão estaria mais próximo à solução utilizada nos ensaios de liberação controlada. Porém, a ficha técnica da enzima também cita o acetato como melhor reagente para usar como tampão (Novozymes, 2011). A temperatura de 25°C foi estudada para verificar se durante o processo de secagem das amostras com a enzima

imobilizada haveria atividade da enzima imobilizada no tecido. Contando-se, neste caso, que nos resultados de liberação controlada possivelmente haverá uma concentração inicial de açúcar redutor total mais elevada, devido a ação da enzima durante o processo de secagem à temperatura ambiente.

Como o objetivo do desenvolvimento deste trabalho foi desenvolver um tecido em que se pudesse ter um processo de liberação durante seu uso, a atividade celulásica total a 37°C também foi avaliada, por ser esta a temperatura em que o corpo humano inicia sua atividade de transpiração. Os resultados do gráfico 2, mostraram que a enzima também pode apresentar atividade nesta temperatura, viabilizando a atividade de liberação do tecido.

A fim de verificar se o suor humano na forma de solução sintética que imita o suor (tampão suor) teria alguma interferência sobre a atividade total da enzima, ensaios foram realizados, ambos com o mesmo procedimento, com os dois tipos de soluções (gráfico 3).

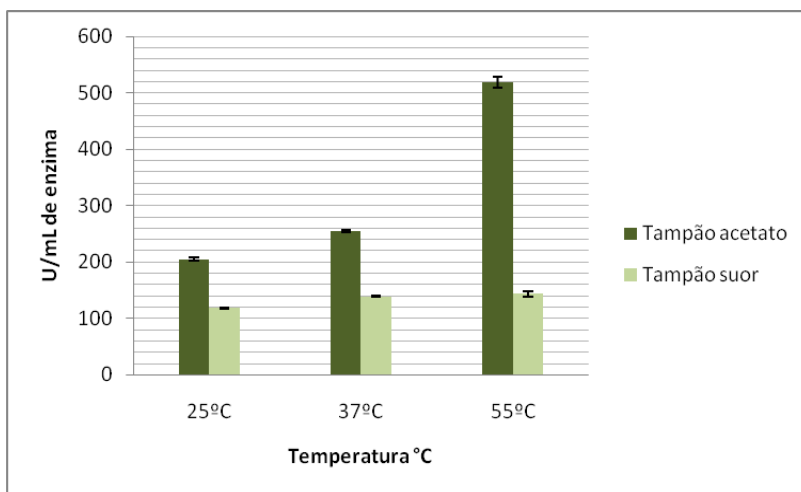


Gráfico 3: Atividade total em diferentes temperaturas na presença dos tampões suor e acetato com pH 5,5.

O tampão suor apresentou uma queda na atividade da enzima quando comparado ao valor da atividade em tampão acetato, porém, como o objetivo é se obter uma liberação controlada, esta diferença pode ser favorável ao processo, pois diminuiria a velocidade de atuação da enzima.

Neste trabalho, corantes reativos foram usados para simular a liberação controlada através da ação da enzima imobilizada no tecido. Desta forma, foi avaliado também se a presença destes corantes causaria algum tipo de inibição. O mesmo procedimento utilizado para determinar a atividade total foi realizado na temperatura ótima de atuação da enzima, onde acrescentou-se uma pequena quantidade dos corantes no tampão acetato. Através dos resultados obtidos (gráfico 4), notou-se que a medida que aumentou-se o tamanho da molécula de corante (mostrados no item 3.2.1) ocorreu um decréscimo da atividade da enzima celulase. Podendo ressaltar que o pior resultado foi verificado para o corante C.I. Azul Reativo 21 (azul21), onde talvez pela presença de um átomo de cobre, ocorreu uma certa inibição da atividade enzimática.

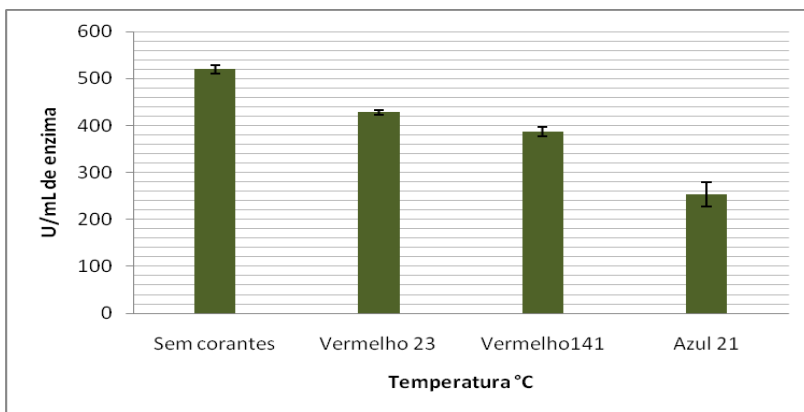


Gráfico 4: Atividade total em tampão acetato na presença dos corantes que serão utilizados como compostos modelos a temperatura de 55°C.

Como citado no item 3.2 as celulasas podem ser classificadas de acordo com seu modo de atuação perante diferentes substratos. O gráfico 5 mostra a atuação do caldo enzimático sobre a carboximetilcelulose (CMC). Por ter caráter amorfo este substrato pode ser hidrolizado principalmente por endocelulasas, liberando oligossacarídeos com extremidades redutoras e não redutoras. Porém, apesar de estar em maior concentração, as endoglucanases apresentaram uma atividade muito inferior a atividade total, sugerindo que pode haver um sinergismo com os outros tipos de enzimas presentes no caldo enzimático. Observou-se um efeito inibitório da enzima quando o tampão suor foi utilizado para medir a atividade.

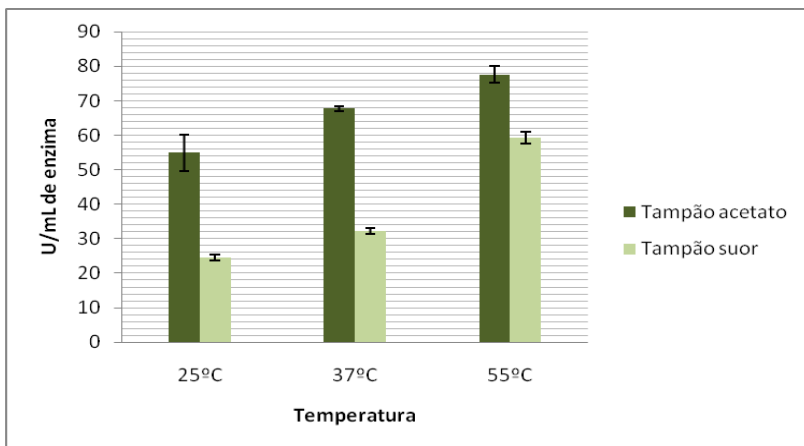


Gráfico 5: Atividade endoglucanásica em diferentes temperaturas na presença dos tampões suor e acetato

Para avaliar se exocelulases estavam atuando no caldo enzimático, mediu-se a atividade sobre um substrato microcristalido com extremidades e não redutoras, denominado comercialmente como Avicel®. O ataque das exoceluloses sobre o substrato libera celobioses, que são atacadas por β -glucosidases. Neste ensaio também foi possível observar um grande efeito inibitório do tampão suor.

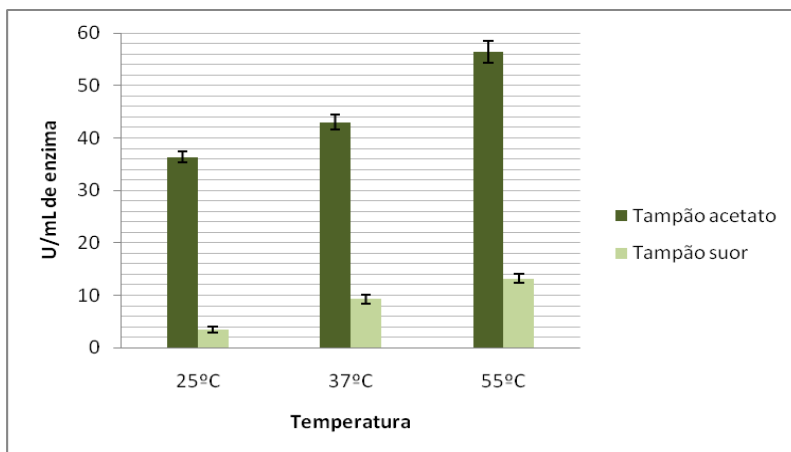


Gráfico 6: Atividade exoglucanásica em diferentes temperaturas na presença dos tampões suor e acetato

4.3 TINGIMENTO DE TECIDO DE ALGODÃO FELPUDO COM CORANTE SINTÉTICO

Tecidos de algodão felpudo foram tingidos com corantes sintéticos a fim de utilizá-los como substrato modelo para poder observar o comportamento do processo de imobilização e de liberação controlada. Os corantes utilizados foram o C.I. Vermelho Reativo 23 (Vermelho 23), o C.I. Vermelho Reativo 141 (Vermelho 141) e C.I. Azul Reativo 21 (Azul 21), ambos, corantes reativos comumente utilizados na indústria têxtil.

Os corantes reativos reagem com a celulose através do mecanismo por adição nucleofílica (figura 33). Como as hidroxilas estão ocupadas com estes corantes, consequentemente existirá uma quantidade menor de hidroxilas disponíveis para reagir com os grupos aldeídicos do agente reticulante. A influência estereoquímica destes corantes na acessibilidade da enzima celulase às ligações β -D1,4 da celulose também foi avaliada.

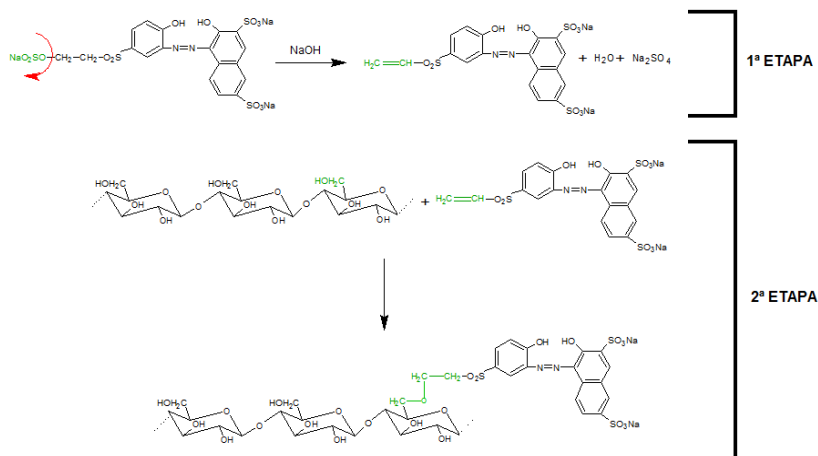


Figura 29: Mecanismo por adição nucleofílica entre a celulose e o corante C.I. vermelho 23. Neste tipo de mecanismo, frequentemente, ocorre uma etapa de eliminação antes da etapa de adição. O corante reativo é catalisado por uma base, então, originando uma dupla ligação com eliminação do grupo de saída. Posteriormente, é adicionado o grupo nucleofílico (CeOH) à dupla, através do mecanismo de adição nucleofílica. Fonte: adaptado de Kimura (2001) e Rosa (2009).

Neste estudo, varreduras espectrais foram realizadas a fim de se obter os picos máximos de absorvância de cada corante (tabela 6). Através destes dados foi possível construir curvas de calibração possibilitando a determinação da concentração de corante durante o processo de tingimento (anexo E).

Tabela 5: Picos máximos de absorvância dos corantes reativos.

Corante	λ_{\max}
C.I. Vermelho 23	542
C.I.Vermelho 141	543
C.I. Azul 21	668

O tingimento foi realizado em um equipamento Jigger de escala laboratorial da marca Mathis (anexo A, figura A2). Alíquotas foram retiradas no início e ao termino do processo para que fosse obtida uma estimativa da quantidade de corante adsorvido no tecido. Os resultados dos tingimentos podem ser observados no gráfico 10.

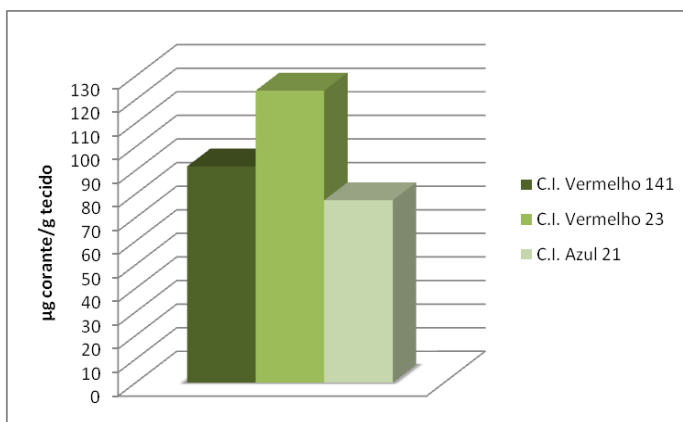


Gráfico 7: Estimativa concentração de corante adsorvido por grama de tecido.

No gráfico 8 é possível observar que concentração de corante adsorvido foi menor de acordo com o tamanho das moléculas de corante

(mostradas no item 3.2.1). As moléculas maiores mostraram-se com tonalidades mais fortes, mas todos os tecidos apresentaram uma uniformidade de cor como mostra a figura 34:



Figura 30: Tecidos de algodão após o tingimento com os corantes C.I Vermelho 23, C.I. Veremelho 141 e C.I. Azul 21.

4.4 PRIMEIRA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO: RETICULAÇÃO DA CELULOSE COM GLUTARALDEÍDO

Nestes ensaios foram realizados testes para saber a influência da temperatura na reação entre o glutaraldeído e a celulose. Após determinar a temperatura ideal foram obtidas as concentrações de glutaraldeído que reagem completamente com a superfície do tecido do algodão e outra em que houvesse mais hidroxilas disponíveis. Todos estes ensaios foram realizados com tecidos sem tratamento, e após a determinação da temperatura e concentrações ideais, estas condições foram estudadas também com os tecidos tingidos.

Para a determinação da concentração de glutaraldeído em todos os ensaios foi utilizado a curva de calibração que consta na figura D1 do anexo D.

4.4.1 Efeito da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído.

O efeito da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído pode ser observado no gráfico 9. Todas as soluções com mesma concentração permaneceram sobre agitação antes do início da reação para se observar se ocorreria polimerização na solução de glutaraldeído.

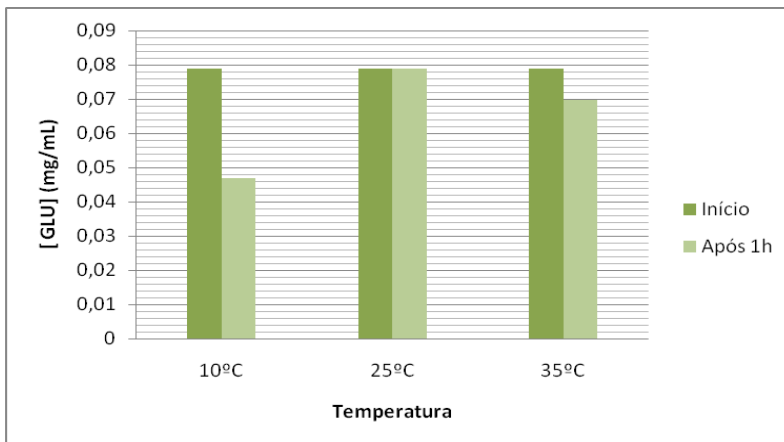


Gráfico 8: Efeito da temperatura na estabilidade da solução de glutaraldeído. Soluções 0,08 mg/mL de glutaraldeído permaneceram sob agitação em determinadas temperaturas e as concentrações iniciais e finais de glutaraldeído foram determinadas.

Nas temperaturas de 10°C e 35°C após o tempo de estabilização a concentração ficou menor, indicando a possibilidade de polimerização do glutaraldeído e conseqüentemente diminuindo a disponibilidade dos grupos aldeídicos, fato que pode ser confirmando através da metodologia aplicada para determinar glutaraldeído. Segundo Boratynski e Zal (1990), os reagentes descritos no método reagem com a carbonila dos grupos aldeídicos e formam um novo composto que absorve fortemente em 282nm, conseqüentemente, quanto menor a quantidade de grupos aldeídicos disponíveis, menor a absorbância.

Após a estabilização das soluções e das temperaturas, amostras de tecido de algodão foram adicionadas à solução e observou-se o efeito da temperatura na reação entre a celulose e o glutaraldeído (gráfico 10).

O mesmo comportamento das soluções de glutaraldeído foi observado na reação com a celulose. Nas temperaturas de 10 e 25°C uma quantidade menor de glutaraldeído reagiu, comparando-se com o comportamento da reação a 25°C. Dois fatos podem estar envolvidos nestes resultados: o primeiro, pelo fato de a reação iniciar com concentração baixa de grupos aldeídicos e a segunda, é a polimerização continuada na solução. Portanto a primeira etapa de imobilização para os demais ensaios foram realizadas a 25°C.

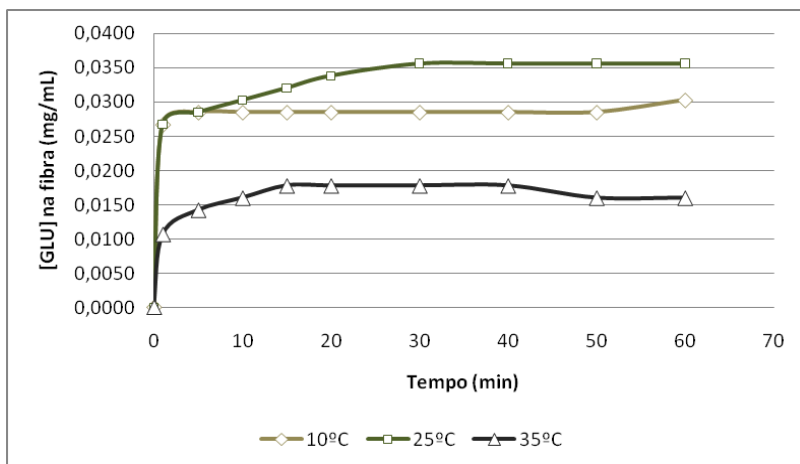


Gráfico 9: Efeito da temperatura na reação do glutaraldeído com a celulose (tecido branco). Soluções de glutaraldeído 0,08 mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora nas temperaturas de 10, 25 e 35°C. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento foram adicionadas e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada.

4.4.2 Efeito da concentração de glutaraldeído que reage com a celulose.

Uma solução de glutaraldeído em excesso foi preparada e posta sob agitação por uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente iniciou-se a reação com a celulose e a concentração de glutaraldeído que reage com a celulose em determinado tempo foi medida. Com este ensaio foi possível observar que a concentração que reagiu como toda a superfície da celulose ficou em torno de 0,035 mg/mL (gráfico 11). Uma nova solução com uma concentração próxima a esta foi preparada e repetiu-se o mesmo procedimento, confirmando que, mesmo com uma concentração inicial de 0,04 mg/mL, a concentração máxima de glutaraldeído que reage com a superfície da amostra de tecido foi de aproximadamente 0,035 mg/mL.

Com a finalidade de investigar futuramente se o excesso de glutaraldeído na superfície da celulose iria interferir no processo de liberação (acessibilidade da enzima imobilizada na celulose), uma solução com menor concentração foi preparada e repetiu-se o mesmo procedimento. Nota-se que durante o tempo de reação de uma hora,

toda a concentração de glutaraldeído adicionada nas concentrações inferiores a concentração de 0,08mg/mL não reagiram totalmente possivelmente por uma pequena polimerização do agente reticulante ou talvez pela diminuição da acessibilidade do polímero ao algodão.

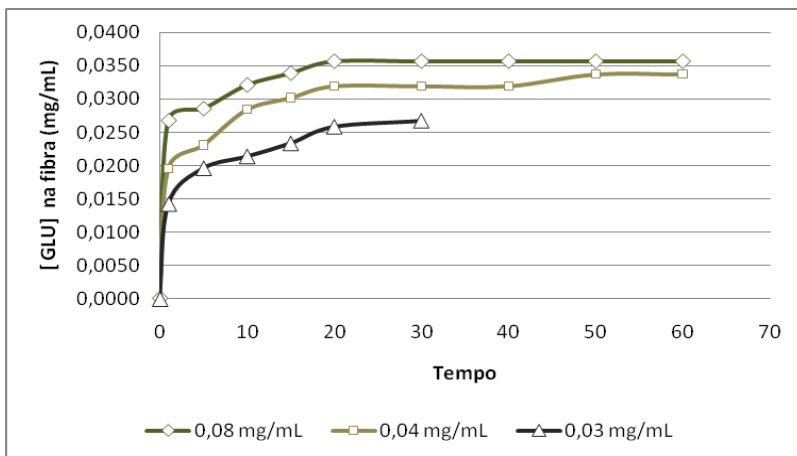


Gráfico 10: Efeito da concentração na reação entre o glutaraldeído e a celulose. Soluções de glutaraldeído 0,08 mg/mL , 0,04mg/mL e 0,03 mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora na temperatura ambiente. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento foram adicionadas e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada.

Com estes dados foi possível adotar a concentração de 0,04 mg/mL como a quantidade de glutaraldeído garante a completa reação entre a superfície da celulose.

Quanto menor a concentração de glutaraldeído, menor a acessibilidade do reagente à superfície da fibra. Por este motivo, foi usada uma concentração menor na tentativa de deixar a superfície não tão ocupada de forma a possibilitar maior a acessibilidade da enzima a fibra. Desta forma utilizou-se a 0,03 mg/mL de GLU como uma concentração que não ocupa totalmente a superfície de 2,5 gramas de celulose na forma de tecido de algodão felpudo.

4.4.3 Efeito da presença dos corantes modelos na acessibilidade do agente reticulante à fibra.

Como citado no item 4.3, após o tingimento, uma grande quantidade de hidroxilas que estavam na superfície da celulose ficaram ocupadas com moléculas de corantes reativos, diminuindo a acessibilidade dos grupos aldeídicos. A partir do gráfico 11 foi possível observar esta influência através da diferença de concentração de glutaraldeído que reagiu com a celulose, que ficou em aproximadamente 30% entre o tecido branco (sem tratamento) e os tecidos que foram tingidos com os corantes reativos. Assim, subte-se que toda a superfície da celulose estará quase que completamente ocupada ou com os corantes ou com o agente reticulante. Podendo neste caso, avaliar se esta saturação na superfície irá interferir no processo de liberação controlada.

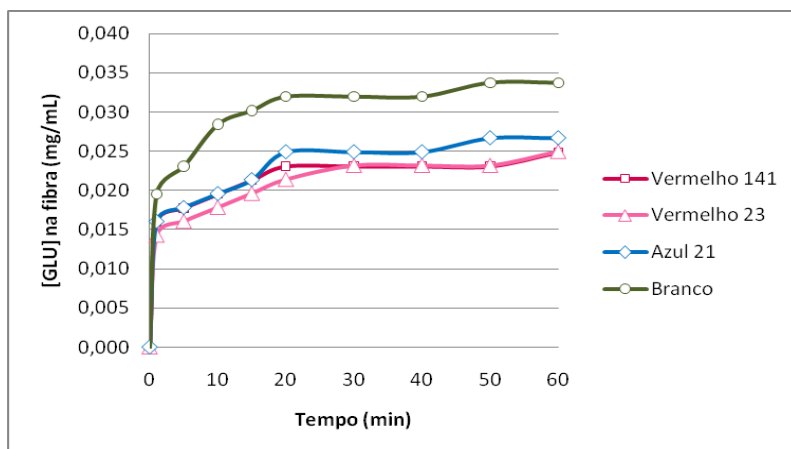


Gráfico 11: Efeito da presença de corantes na reação entre o glutaraldeído e a celulose. Soluções de glutaraldeído 0,04 mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora na temperatura ambiente. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento e tingidas foram adicionadas e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada.

O mesmo procedimento foi realizado com uma concentração menor de glutaraldeído. Esperava-se que como na situação em excesso de glutaraldeído os tecidos tingidos adsorveram cerca de 0,025 mg/mL de glutaraldeído na superfície da celulose, colocando-se uma

concentração inicial de glutaraldeído de 0,03mg/mL que esta reagisse completamente com a celulose. Entretanto, como é observado no gráfico 13, houve uma diferença de aproximadamente 35% em relação a concentração de saturação dos tecidos tingidos (gráfico 12), mostrando que possivelmente restaram hidroxilas que não reagiram e consequentemente, neste caso, não há uma condição de saturação na superfície da celulose. Nas etapas de liberação controlada será possível avaliar se esta situação trará benefícios à acessibilidade da enzima imobilizada às ligações β -D1,4 da celulose.

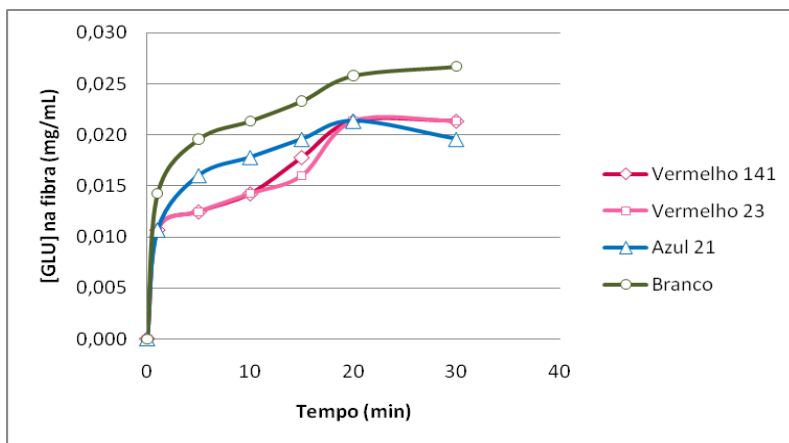


Gráfico 12: Efeito da presença de corantes na reação entre o glutaraldeído e a celulose. Soluções de glutaraldeído 0,03mg/mL permaneceram sob agitação por 1 hora na temperatura ambiente. Logo após amostras de 2,5g de tecido sem tratamento e tingidos foram adicionados e a concentração de glutaraldeído adsorvido no tecido foi determinada.

4.5 SEGUNDA ETAPA DE IMOBILIZAÇÃO: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA QUE REAGE COM O AGENTE RETICULANTE PRESENTE NA SUPERFÍCIE DA FIBRA.

Para completar o estudo de imobilização da enzima na superfície do tecido de algodão, foi determinada a concentração de enzima que reage com o glutaraldeído que já está fixado na superfície da celulose. Para este procedimento foram utilizadas as concentrações de glutaraldeído de 0,03 mg/mL e 0,04 mg/mL.

Para este estudo, a primeira etapa (reticulação do glutaraldeído com a celulose) obedeceu aos mesmos procedimentos realizados nos itens anteriores, posteriormente o tecido foi lavado para a retirada do excesso de GLU. Logo em seguida este tecido tratado foi posto em contato com uma solução de enzima (segunda etapa da imobilização). Esta última etapa ocorreu a 0°C para evitar que a enzima apresentasse atividade sobre o substrato celulósico. E utilizando o método de Bradford, foi possível determinar a concentração de proteína que reagiu com estas concentrações de glutaraldeído através de uma curva de calibração como concentrações de proteína de 0 a 0,1mg/mL (anexo C, figura C2).

Para a concentração de glutaraldeído de 0,04 mg/mL foi utilizado uma concentração em excesso de enzima (21,5µg/mL) e observou-se que aproximadamente 900µg de proteína reagiu com esta concentração de glutaraldeído (gráfico 14). Para obter a confirmação deste resultado, uma nova solução contendo aproximadamente 900µg de proteína foi usada, repetindo-se o mesmo procedimento e confirmando que esta é a concentração de enzima que pode reagir com o glutaraldeído adsorvido na celulose.

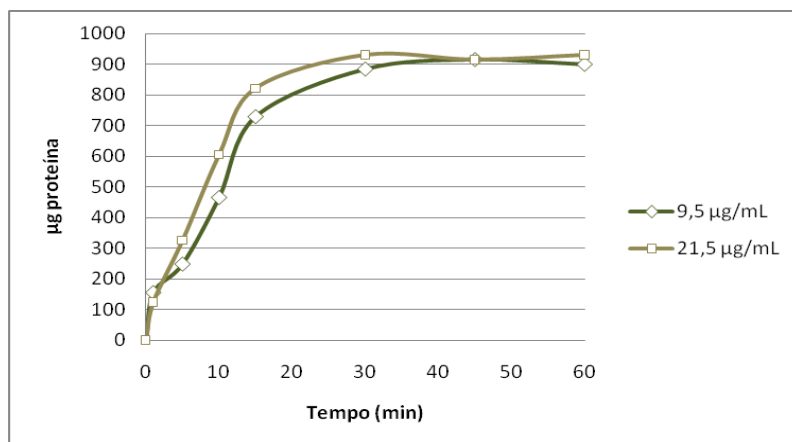


Gráfico 13: Concentração de proteína que reagiu como o glutaraldeído presente na fibra. Após a primeira etapa de imobilização com GLU 0,04 mg/mL, este tecido permaneceu em contato com 100mL soluções de enzima diluída a 0°C. Neste período foi possível a obtenção da concentração de enzima que reage com o glutaraldeído adsorvido na celulose.

O mesmo procedimento foi realizado com a segunda concentração de glutaraldeído (0,03mg/mL). Primeiramente uma concentração em excesso de enzima foi utilizada, e verificou-se que aproximadamente 450µg de proteína reagiram com o glutaraldeído presente na fibra (gráfico 15). Uma nova solução foi preparada com aproximadamente esta concentração e confirmou-se que apenas 450µg de proteína reagiram.

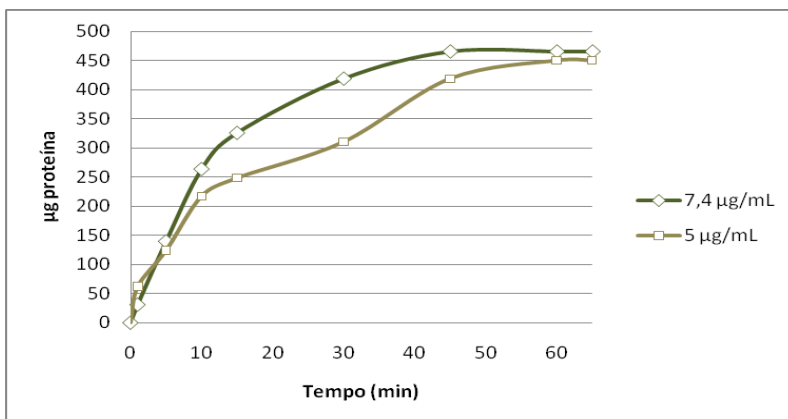


Gráfico 14: Concentração de proteína que reagiu como o glutaraldeído presente na fibra. Após a primeira etapa de imobilização com GLU 0,03 mg/mL, este tecido permaneceu em contato com 100mL soluções de enzima diluída a 0°C . Neste período foi possível a obtenção da concentração de enzima que reage com o glutaraldeído adsorvido na celulose.

Portando, para a concentração de glutaraldeído de 0,03mg/mL será usado 5µg/mL de enzima e para a concentração de glutaraldeído 0,04mg/mL será utilizado 9,4µg/mL de enzima para os procedimentos de imobilização nos ensaios de liberação controlada que serão descritos no item 4.6.

4.6 LIBERAÇÃO CONTROLADA DOS CORANTES REATIVOS PRESENTES NO TECIDO COM A ENZIMA IMOBILIZADA.

A proposta deste trabalho previa criar um mecanismo de liberação controlada através da imobilização de uma enzima celulase em substrato de celulose. Assim, reagindo algumas hidroxilas com um

composto modelo, e posteriormente outras hidroxilas com um agente reticulante e a este uma enzima celulase, poder-se-ia desenvolver um mecanismo de liberação controlada, pois ao usar a peça (tecido com este acabamento), o suor e a umidade proporcionariam um acesso da enzima à ligação β -(1 \rightarrow 4) da celulose, liberando pequenos fragmentos que continham o composto modelo.

Cavaco-Paulo et al. (2007), propôs um possível mecanismo de ligação cruzada para a reação entre a celulose, o glutaraldeído e a enzima (figura 15). Entretanto, não há ainda um acordo entre as literaturas para relatar as principais espécies reativas do glutaraldeído que participam no processo de cruzamento, porque as formas monoméricas e poliméricas estão em equilíbrio (Yoshioka et al, 1995). Existem alguns estudos que indicam alguns supostos produtos de reações entre a enzima e o glutaraldeído dependendo do meio em que estão (Walt e Agayn, 1994). Por este motivo, e principalmente, por não fazer parte da proposta deste trabalho caracterizar estes produtos de reação, não foi indicado nenhum esquema de possível mecanismo.

O que se pode afirmar é que com o processo de imobilização a região em torno da enzima se torna mais rígida e conseqüentemente toda a molécula de enzima se torna muito mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por agentes desnaturantes (Guisán et al., 1991; Adriano et al., 2003).

Um dos objetivos deste estudo foi observar se, dificultando ou facilitando o acesso da enzima à celulose, possibilitaria algum tipo de interferência no processo de liberação controlada.

Para isto, foram utilizados corantes reativos com diferentes formas estruturais. Os corantes utilizados, como citados no estudo anterior, foram:

- C.I. Vermelho Reativo 23: que apresenta uma estrutura pequena e aparentemente mais simples quando comparado aos demais (figura 21);
- C.I. Vermelho Reativo 141: que apresenta uma estrutura com características semelhantes ao C.I. Vermelho Reativo 23, porém com uma estrutura muito maior (figura 22);
- C.I. Azul Reativo 21: apresentando uma estrutura mais complexa e se diferenciando dos demais por apresentar um átomo de cobre, que possivelmente teria alguma interferência na atividade enzimática (figura 23);

Outro fato relevante deste trabalho foi observar se a saturação da superfície da celulose pelo agente reticulante teria alguma influência sobre o processo de liberação controlada. Assim, como estudado no item 4.4.2, avaliou-se a utilização de duas concentrações de glutaraldeído. Uma em que possivelmente toda a superfície estivesse ocupada com o agente reticulante, dificultando o acesso da enzima à celulose, e outra em que possibilitasse um maior acesso.

Todos os procedimentos de liberação controlada foram comparados com tecidos brancos que não apresentavam a presença de corantes na sua estrutura. A ação da enzima é enfatizada nas análises de açúcares redutores totais, que são os principais produtos de hidrólise da celulose pela celulase. Foi determinada também durante o processo de liberação controlada a concentração de enzima liberada. Para os ensaios foram utilizadas curvas de calibração para a determinação da concentração de açúcar redutor (anexo B, figura B3), concentração de proteína (anexo C, figura C3), concentração do corante C.I. Vermelho Reativo 23 (anexo E, figura E5), concentração do corante C.I. Vermelho Reativo 141 (anexo E, figura E4) e para a concentração do corante C.I. Azul Reativo 21 a curva destacada na figura E3 do anexo E.

O gráfico 16 mostra os resultados de liberação controlada do C.I. Vermelho Reativo 23. É possível observar que com o aumento da concentração de glutaraldeído e de enzima, ocorreu um aumento da concentração de corante liberado, e demonstra que a hipótese levantada, de que se ocorresse a saturação da superfície da celulose pelo agente reticulante conseqüentemente teria uma menor liberação de corante, foi descartada. É possível ressaltar também que a concentração de corante liberado foi superior tanto no desbotamento do tecido sem nenhum tratamento quanto no tecido tratado apenas com a primeira etapa (com glutaraldeído), indicando que a liberação do corante nos tecidos com o tratamento teve a ação da enzima imobilizada.

Após as etapas de imobilização os tecidos permaneceram a 4°C para completar a reação e posteriormente foram secos à temperatura ambiente e armazenadas em dessecador. Como previsto no item 4.2, foi possível observar que nos testes de atividade enzimática a enzima livre apresentou certa atividade em temperatura ambiente - temperatura em que foi realizado o processo de secagem (Gráfico 4). Podendo ser observado com o incremento da concentração de corante liberado aos 7 minutos de ensaio, nos tecidos com a enzima imobilizada (Gráfico 16).

Pelo gráfico 15, pode-se observar também que a concentração de corante liberado foi proporcional as [GLU] e [enzima] aplicadas no tecido. Descartando-se a hipótese de que se ocorresse a saturação da

superfície da celulose pelo agente reticulante consequentemente teria uma menor liberação de corante pelo fato de diminuir o acesso da enzima às ligações β -D1,4 da celulose. Assim, o tecido que recebeu o tratamento apenas com agente reticulante teve uma concentração de corante liberado muito inferior aos tecidos com a enzima imobilizada, indicando que a liberação do corante só foi possível através da enzima.

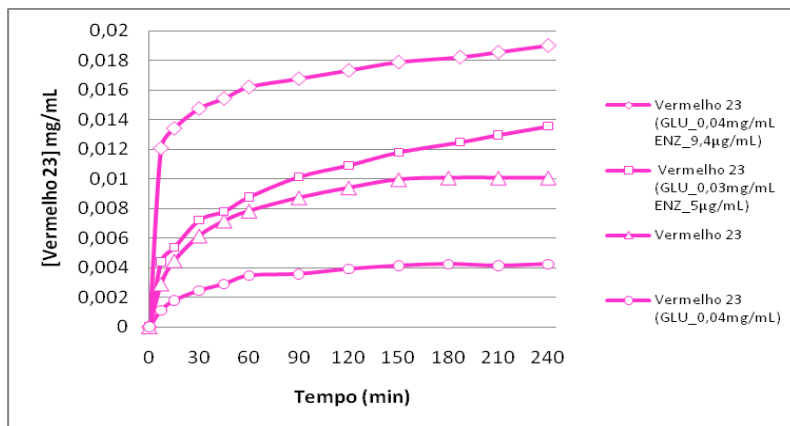


Gráfico 15: Liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho Reativo 23. No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos.

No gráfico 16, observa-se que os tecidos tingidos apesar de ter as mesmas concentrações de enzima que o tecido sem tratamento, liberaram concentrações menores de açúcar redutor. Por este motivo sugere-se que a molécula de corante pode ter dificultado a acessibilidade da enzima às ligações 1,4 da celulose e também pelo fato do tecido com corante ter reagido com uma menor concentração de agente reticulante.

No processo de liberação controlada não foi desejável a liberação de enzima, mas inevitavelmente, pode-se observar uma pequena concentração de proteína, visto que, quando a enzima age sobre o substrato, o fragmento de algodão liberado pode conter enzima imobilizada.

É de fundamental importância salientar que nestes ensaios, a concentração de proteína foi muito baixa, dificultando a análise, já que as absorvâncias obtidas após a adição do corante azul de comassie foram extremamente baixas, proporcionando maior probabilidade de erro experimental e desvios do método.

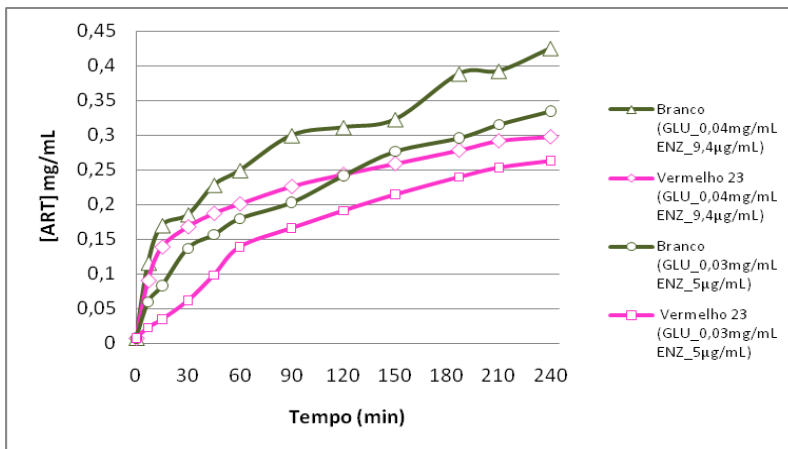


Gráfico 16: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho Reativo 23 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

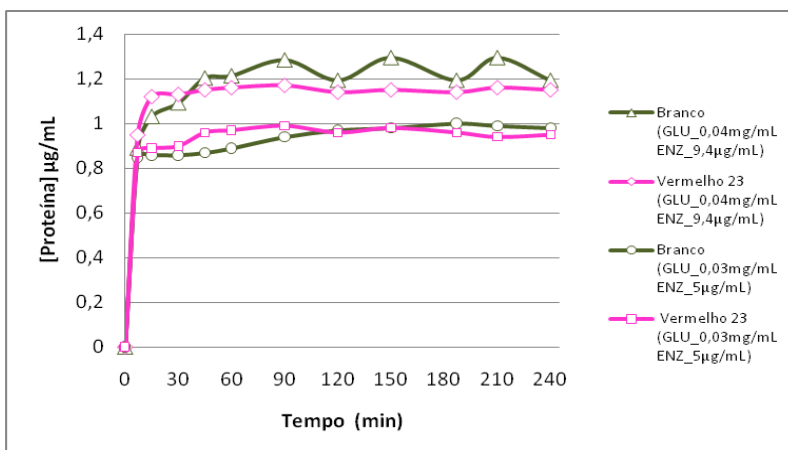


Gráfico 17: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 23 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

Com o corante modelo C.I. Vermelho Reativo 141 obteve-se o mesmo comportamento em relação ao corante liberado, quando comparado à liberação pelo corante C.I. Vermelho Reativo 23 (gráfico 19 e 16). Esperava-se que a estrutura molecular do corante poderia apresentar alguma interferência na ação da enzima, ou seja, dificultar o acesso da enzima à celulose, mas não foi observado, já que ambas liberaram quantidades de corantes proporcionais a sua massa molecular. Observa-se também que nos gráficos 15 e 18 que o tecido reticulado com glutaraldeído teve uma maior resistência no desbotamento, evidenciando ainda mais a ação da enzima nos tecidos onde estas foram imobilizadas.

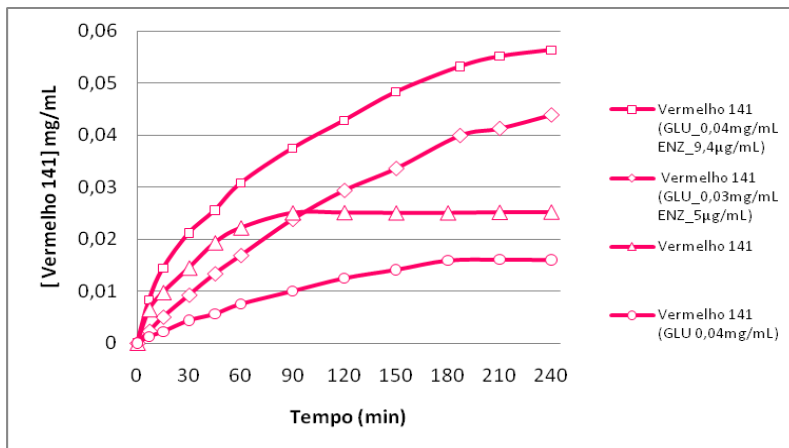


Gráfico 18: Liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 141. No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos.

A possibilidade de interferência da acessibilidade da enzima a ligação $\beta(1 \rightarrow 4)$ da celulose também pode ser descartada comparando-se os valores obtidos de açúcares redutores totais para os dois corantes vermelhos (gráficos 17 e 20), pois independentemente do tamanho da molécula, os valores de ART foram próximos. Assim como no caso do “Vermelho 23”, a concentração de ART do composto modelo C.I. Vermelho 141 foi inferior quando comparados ao tecido sem nenhum tratamento.

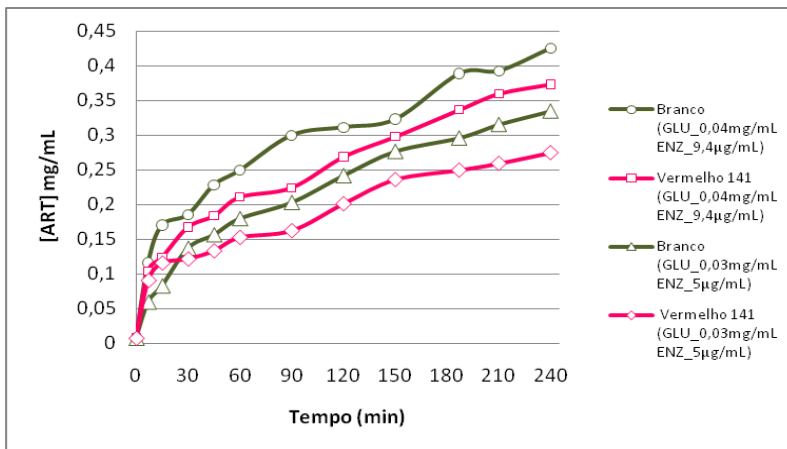


Gráfico 19: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberado durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 141 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

Assim como no processo de liberação do corante C.I. Vermelho Reativo 23 (gráfico 18), neste ensaio também foi observado uma pequena liberação de enzima (gráfico 21). Observa-se que cerca de 10% da enzima foi liberada para o tecido com concentrações maiores de enzima, bem como aproximadamente 20% para a menor concentração de enzima liberada. Resultados estes que são próximos ao encontrado para o ensaio de liberação controlada do tecido com o corante “Vermelho 23” (gráfico 18).

Ao contrário dos resultados obtidos pelos corantes vermelhos, os ensaios de liberação do corante Azul 21 não foram satisfatórios. O gráfico 22 mostra que a concentração de corante liberado pelo tecido sem nenhum tratamento foi superior aos demais ensaios. Isto pode ser atribuído à baixa solidez a lavagem que este tecido apresentou. Impossibilitando assim a comparação dos resultados.

Porém, através do gráfico 23, que indica os resultados de liberação de açúcares redutores totais, pode-se observar que houve atividade pela enzima e que o processo de liberação ocorreu, mas devido a baixa solidez à lavagem do tecido tingido não foi possível observar as diferenças de liberação do corante azul 21.

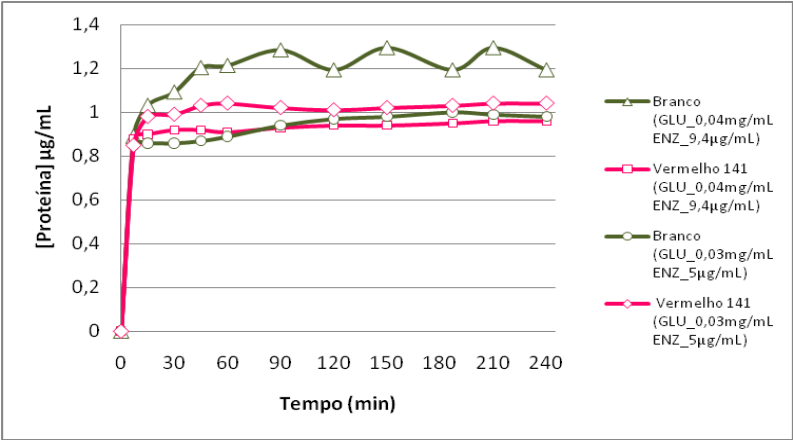


Gráfico 20: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Vermelho 141 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

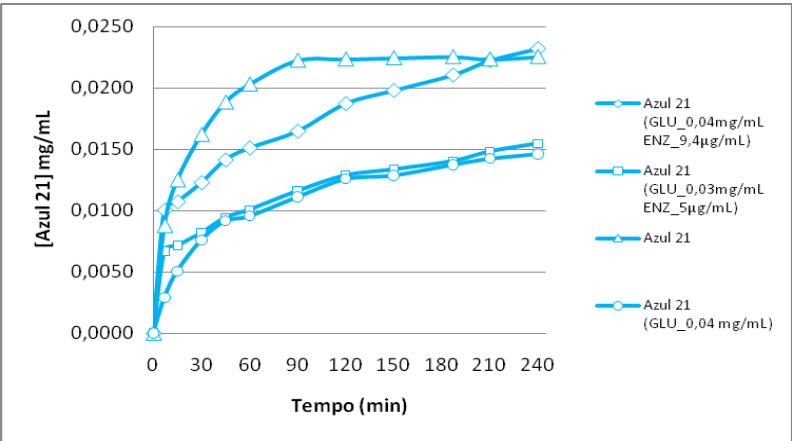


Gráfico 21: Liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Azul 21. No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos.

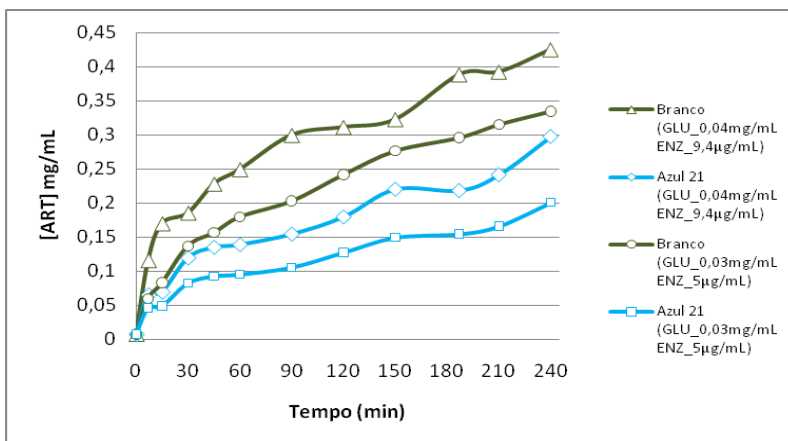


Gráfico 22: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberado durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Azul 21 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

As concentrações de enzima liberadas neste ensaio (gráfico 24), também apresentaram resultados próximos aos encontrados na liberação dos tecidos tingidos com os corantes vermelhos.

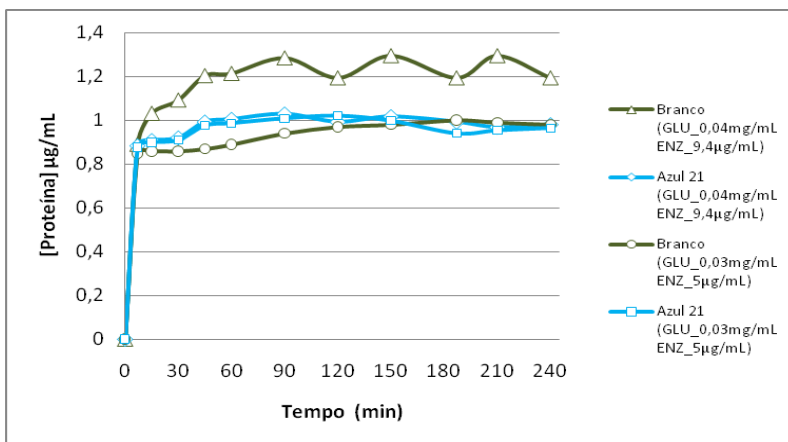


Gráfico 23: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante C.I. Azul 21 durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi empregada para avaliar as características morfológicas dos tecidos com e sem as etapas de imobilização. Para este procedimento utilizou-se apenas os tecidos tingidos com o Vermelho 23 e comparando-os com o tecido sem tratamento (tecido branco). As figuras 35 e 36 mostram que aparentemente não houve mudanças na superfície dos tecidos. Alterações foram observadas no tecido que sofreu o processo de liberação em tampão suor e nos tecidos que passaram pelo processo de imobilização da enzima. Nestas amostras vários cortes (rupturas) apareceram na estrutura na fibra, possivelmente pela ação da enzima durante o processo de imobilização, secagem e liberação controlada.

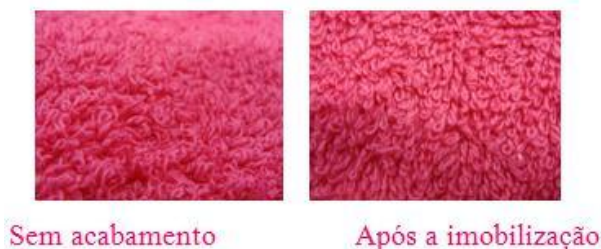


Figura 31: Tecidos tingidos com C.I. Vermelho Reativo 23 com sem o processo de imobilização.

Alguns autores citam outras técnicas para observação em nanoescala da enzima imobilizada em celulose. Walker et al. (2008) mostram através da técnica de microscopia de fluorescência a interação entre de enzimas imobilizadas em celulose. Nas imagens demonstradas na figura 37 é possível observar a enzima marcada com agente fluorescente.

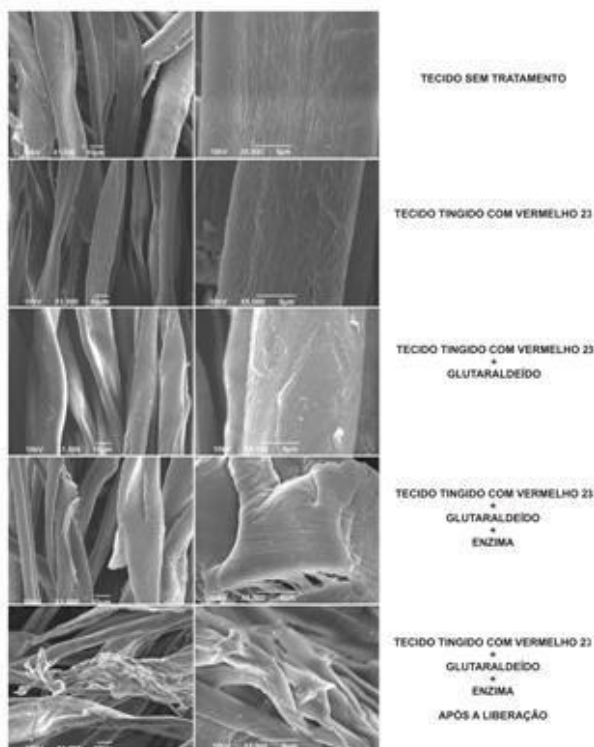


Figura 32: Microscopia eletrônica de varredura dos tecidos tingidos com C.I. Vermelho Reativo 23 com e sem etapas de imobilização, comparados com o tecido sem nenhum tratamento (branco).

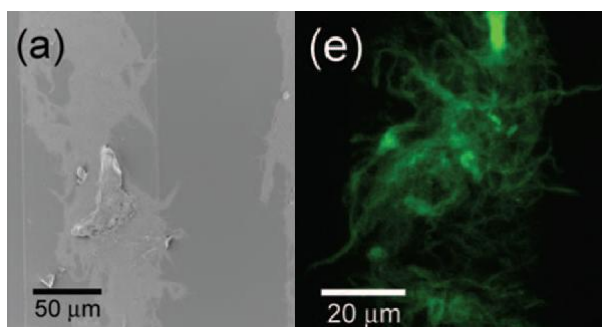


Figura 33: Imagens de Enzima imobilizada em Celulose obtida no trabalho de Walker et al. (2008) (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (E) Microscopia de Fluorescência.

4.8 ENSAIOS COM O CORANTE NATURAL CÚRCUMA

4.8.1 Tingimento do tecido de algodão felpudo com cúrcuma e processo de imobilização do tecido.

Sabe-se que a ação da cúrcuma pode ser atribuída principalmente aos componentes fenólicos contidos em sua estrutura que exercem efeito antioxidante. Seus pigmentos apresentam duas hidroxilas fenólicas, sendo um composto β -dicarbonílico, e um grupo dicetona, classes estas, que são consideradas as principais classes de metabólitos responsáveis pelas propriedades do rizoma de cúrcuma, seguidos pelos óleos essenciais (Lachance et al, 1997).

A fim de avaliar se o corante natural teria alguma atividade antimicrobiana quando liberado em pequenas quantidades, tecido de algodão foi tingido com um extrato alcoólico de rizomas de cúrcuma. Procedeu-se o mesmo processo de imobilização aplicado ao tecido com corante modelo sintético com a concentração de glutaraldeído elevada. Na figura 38, observa-se uma diferença de tonalidade entre o tecido tingido com o corante natural com e sem o processo de imobilização.



Figura 34: Tecido tingido com corante natural cúrcuma com e sem o processo de imobilização.

Um fator que pode justificar a mudança de coloração no tecido com a enzima imobilizada pode ser que a presença de glutaraldeído pode ter reduzido drasticamente o pH da superfície, fazendo com que o corante fique na forma protonada e portando como descrito no item 2.5 a cor tende a ficar avermelhada.

4.8.2 Avaliação da liberação controlada do corante natural

O procedimento de liberação utilizado foi o mesmo para os corantes sintéticos. O gráfico 25 exibe o comportamento da liberação dos tecidos tingidos com enzima imobiliza e só com o glutaraldeído, fazendo uma comparação do tecido tingido sem nenhum tratamento. O tecido com enzima imobilizada liberou uma quantidade superior de corante indicando que o processo de liberação controlada ocorre em função da presença da enzima imobilizada.

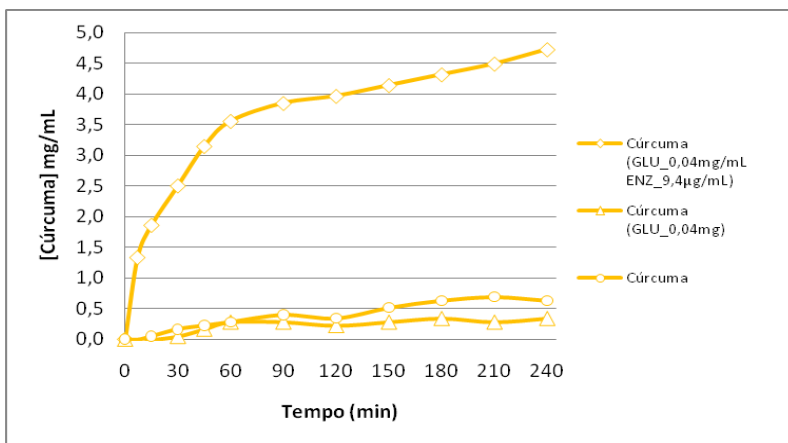


Gráfico 24: Liberação controlada do tecido tingido com o corante natural Cúrcuma. No gráfico é mostrada a concentração de corante liberado durante 240 minutos pelos tecidos com diferentes tratamentos.

Entretanto, esta concentração de corante liberado poderia ser maior, pois como foi utilizado um corante natural, é normal ocorrer uma certa degradação natural do corante. O ensaio de liberação controlada foi realizado sem a presença de luz através de uma proteção com papel laminado. Mas outro fator relevante foi a temperatura, que neste caso, contribuiu para uma pequena degradação do corante. Para verificar esta hipótese, uma solução de cúrcuma em tampão suor (ao abrigo da luz) foi posta nas mesmas condições do processo do ensaio de liberação e suas absorbâncias iniciais e finais medidas (tabela 7). Neste teste obteve-se 23% de degradação do corante ao término do experimento. Mostrando que a temperatura teve uma influência na degradação do corante cúrcuma.

Tabela 6: Absorbâncias iniciais e finais a 425nm de uma solução de cúrcuma em tampão suor e a sua degradação após 60 minutos, sob agitação de 60 rpm a 37°C.

Absorbância _{INICIAL}	Absorbância _{FINAL}	%Degradação
0,2101±0,029	0,1617±0,031	23%

A concentração de açúcares redutores totais liberados pelo tecido com cúrcuma foi superior nos primeiros 60 minutos, após, como esperado, já que no tecido branco teoricamente houve uma maior concentração de enzima imobilizada, a sua concentração foi inferior ao tecido sem corante (gráfico 26). Este gráfico pode complementar os resultados obtidos pelo gráfico 25, já que à medida que a enzima quebra a celulose ocorre a liberação de açúcares que contém em suas estruturas o corante natural.

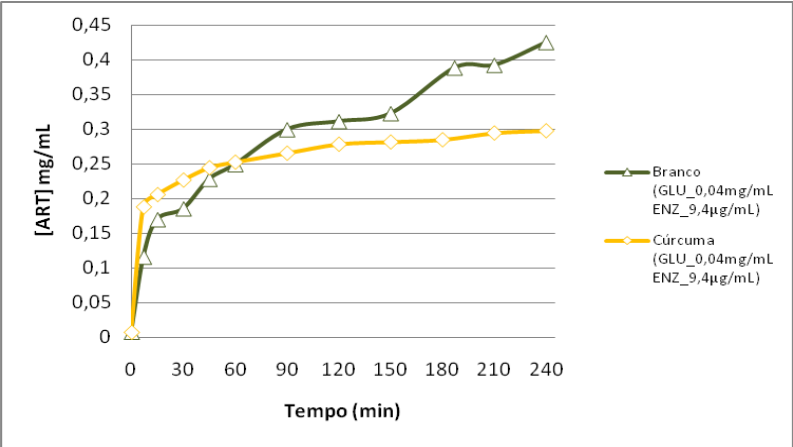


Gráfico 25: Concentração de açúcares redutores totais (ART) liberado durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante natural Cúrcuma durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

Como ocorreu nos ensaios com corantes sintéticos, neste caso também se observou a liberação de uma pequena quantidade de enzima (gráfico 27). Já que juntamente aos fragmentos de celulose liberados possivelmente encontra-se enzima imobilizada.

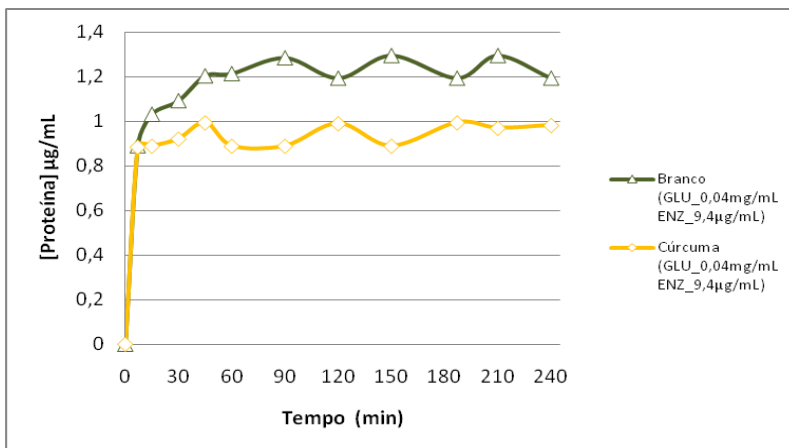


Gráfico 26: Concentração de proteína liberada durante o processo de liberação controlada do tecido tingido com o corante natural Cúrcuma durante 240 minutos. Os resultados são comparados com tecidos brancos que foram submetidos ao mesmo tratamento.

4.8.3 Microscopia eletrônica de varredura do tecido tingido com cúrcuma

Assim como ocorreu no caso dos ensaios como corante sintéticos, a morfologia observada pelo microscópio eletrônico de varredura apresentou alterações apenas na amostra de tecido que passou pelo processo de liberação na presença de tampão suor, como mostra a figura 39.

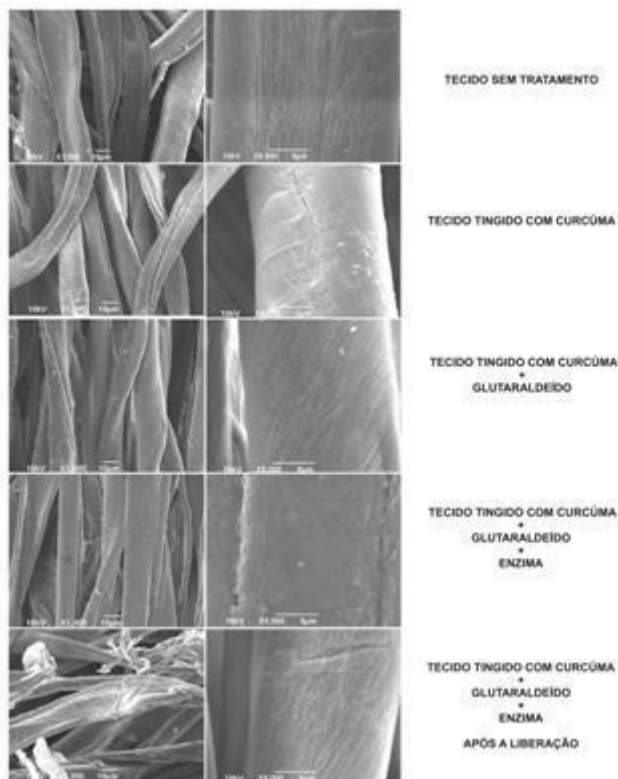


Figura 39: Microscopia eletrônica de varredura dos tecidos tingidos com cúrcuma com e sem etapas de imobilização, comparados com o tecido sem nenhum tratamento (branco).

4.8.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos tecidos tingidos.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos tecidos tingidos com cúrcuma foi realizada com cepas liofilizadas de bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e Gram-negativas - *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

Estas bactérias são responsáveis por uma ampla variedade de infecções de caráter oportunistas em seres humanos, como no caso dos gêneros *Staphylococcus* comumente relacionados como os precursores de furúnculos na pele ou conjutivite (ANVISA, 2010; Nakano et al., 2002), *Escherichia* - que estão presentes no intestino humano, mas

podem se tornar perigosas se disseminadas em outros órgãos (Murray, 2004) ou o gênero *Salmonella* que em caso de ingestão é responsável por doenças nasocomiais (Trabulsi e Alterthum, 2004).

Nos ensaios, as amostras de tecidos foram postas em um meio de cultura com as cepas inoculadas. Neste tipo de ensaio é previsto que a partir da difusão do agente antimicrobiano ocorra o aparecimento de um halo de inibição (Vandenberghe & Vlietinck, 1991). Esperava-se, portanto, que os pigmentos ao serem liberados pela ação da enzima fossem difundidos no meio de cultura e tivessem ação antimicrobiana contra os gêneros estudados, mas como é demonstrado na figura 40, não foi observada nenhuma atividade antimicrobiana sobre os microorganismos testados.

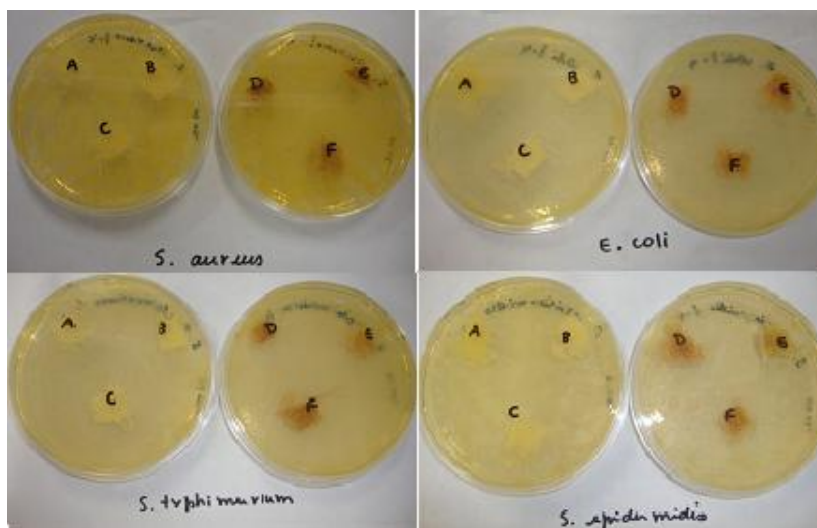


Figura 35: Ensaios para avaliação da formação de halos de inibição de tecidos tratados contra bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e Gram-negativas - *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. [A] Tecido branco sem tratamento. [B] Tecido branco com glutaraldeído. [C] Tecido com enzima imobilizada. [D] Tecido tingido com cúrcuma. [E] Tecido tingido com cúrcuma e reticulado com glutaraldeído. [F] Tecido tingido com cúrcuma e com imobilização da enzima.

É importante salientar que vários autores têm destacado a atividade antimicrobiana dos corantes curcuminóides principalmente para a bisdesmetoxicurcumina (Péret-Almeida et al., 2008), evidenciando que a existência de grupos hidroxila e metoxila nas estruturas podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana dos pigmentos da cúrcuma (Han e Choi, 2000, 2002). Entretanto Singh et al. (2002b) também demonstraram que os pigmentos de curcuminóides não apresentaram atividade em relação a *S. aureus*, *E. coli*.

Grande parte da atividade antimicrobiana da cúrcuma tem sido atribuída também às propriedades dos óleos essenciais, principalmente pela presença de monoterpenos e sesquiterpenos (COWAN, 1999). Segundo Singh et al. (2002 a,b), o óleo essencial presente na cúrcuma apresentou atividade contra bactérias e fungos, principalmente *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, e *S. typhimurium*, além de *Candida albicans*, *Fusarium moniliforme*, *C. pallencens*, *F. oxysporum*, *C. falcatum* e *A. niger*.

Apesar de se ter usado o extrato alcoólico de rizomas naturais de cúrcuma os óleos essenciais, por serem extremamente voláteis, foram perdidos durante os processos de tingimento e imobilização, não contribuindo para a ação antimicrobiana da cúrcuma liberada.

Outro fator que pode ter inibido a ação antimicrobiana da cúrcuma deve-se a possibilidade de modificação estrutural da molécula do corante pelo agente reticulante, inibindo sua ação antioxidante. Esta modificação pode ser verificada através da mudança de tonalidade do material após o processo de imobilização, demonstrada na figura 39.

Apesar de não ter formado halos de inibição, o processo mostrou que é possível se ter a liberação de corantes ou qualquer outra molécula aderida na superfície da celulose. Porém, há a necessidade de mecanismos de proteção da parte ativa da molécula, para que não perca a sua atividade.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 CONCLUSÕES

✓ O caldo enzimático da enzima novoprime®969 apresentou uma concentração de proteínas de 62,1 mg/mL, estas foram separadas através da técnica de eletroforese apresentando quatro diferentes bandas, sendo identificadas as endoglucases como enzima em maior concentração no caldo enzimático;

✓ Através da atividade total foi possível definir os valores de 55°C e pH 5,5 como a temperatura e pH ótimos de ação da enzima celulase.

✓ Nos processos de liberação controlada para os corantes vermelhos, foi possível observar um incremento da concentração de corante liberado a medida que aumentou-se a quantidade de enzima imobilizada. O mesmo comportamento também foi observado para a quantidade de açúcares redutores liberados. Durante os processos de liberação controlada também foi observado a liberação de pequenas quantidades de enzimas, que foram quantificadas através do teor de proteína.

✓ A liberação do corante azul não foi observada devido a baixa solidez do corante na presença do tampão suor ácido. Entretanto os resultados de liberação de açúcares redutores mostrou que o incremento de enzima imobilizada aumentou o número de fragmentos de celulose liberados. Os testes de liberação de enzima comprovaram que nestes fragmentos haviam enzimas imobilizadas.

✓ As análises através da Microscopia Eletrônica de Varredura dos tecidos com e sem o processo de imobilização, mostraram alteração morfológica apenas nos tecidos que sofreram processo de liberação e/ ou imobilização.

✓ Os tecidos tingidos com o corante natural sofreram alterações físicas observadas a partir da mudança de tonalidade. Várias hipóteses foram levantadas para justificar o fenômeno, entre elas a possibilidade de variaram do pH na superfície da fibra.

✓ O processo de liberação controlada nos tecidos tingidos com corante natural mostrou uma alta concentração de corante liberado,

quando comparado com os tecidos sem enzima. As concentrações de açúcares redutores e enzimas liberadas também demonstrou que há a liberação de fragmentos com celulases liberadas.

✓ Os comportamentos das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram-se semelhantes aos observados para os corantes sintéticos, tendo alterações apenas nas amostras com a enzima imobilizada.

✓ A avaliação da atividade antimicrobiana dos tecidos tingidos com cúrcuma foi realizada com cepas liofilizadas de bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e Gram-negativas - *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, ambas agentes patogênicas da derme humana. Os ensaios para formação dos halos de inibição não foram satisfatórios, para este resultados foram observadas várias hipóteses entre elas a possibilidade de modificação estrutural da molécula do corante natural pelo agente reticulante, inibindo sua ação antioxidante.

✓ Neste trabalho criou-se um processo de liberação controlada através da imobilização de enzima celulase em substrato de celulose através do uso de glutaraldeído como agente reticulante. O mecanismos de liberação controlada para os corantes sintéticos vermelhos e para o corante natural mostraram-se com grande viabilidade, porém não possível observar a atividade antimicrobiana nos corantes naturais.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.

Como sugestões para trabalhos futuros ficaram as seguintes constatações:

- ✓ Desenvolver nanocápsulas com agentes antimicrobianos e ou/ aromatizantes, capazes de interagir fortemente com as hidroxilas presentes no substrato celulósico, de forma a preservar suas características químicas responsáveis pelo poder antioxidante e aromático;
- ✓ Avaliar a toxicidade do material para contato direto com a derme humana;
- ✓ Desenvolver um processo de imobilização sem a necessidade de uso de baixas temperaturas, possibilitando uma perspectiva de desenvolvimento em escala industrial.

CAPÍTULO 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, Wellington S.; BRASILEIRO, Daniel D.; GONÇALVES, Luciana R. B. **Influência da Concentração de Glutaraldeído no Estudo da Imobilização de Penicilina G Acilase em Quitosana**. XI Simpósio Nacional de Fermentações, 2003. Disponível em <www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t174.doc> acesso em Julho de 2010.

AHNA, J. K. et al. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against hepatitis B virus replication. **Journal of Ethnopharmacology**, 2009. p. 189–196, 124;

ALMEIDA, L.P. **Caracterização de pigmentos da curcuma longa L.: Avaliação da atividade antimicrobiana, morfogênese in vitro na produção de curcuminóides e óleos essenciais**. 2006. Tese em Ciências de Alimentos - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006;

ANAND, L.; VITHAYATHIL, P. J.; *J. Ferm. Bioeng.* **1989**, 67, 380.

ARUN N, NALINI, N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. **Plant Foods Hum Nutr.**, 57, p. 41-52, 2002.

ASAI, A.; MIYAZAWA, T. Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. **J. Nutr.**, v. 11, n. 131, p. 2932-2935, 2001;

AWASTHI, S. et al. Curcumin protects against 4-hydroxy-2-trans-nonenal-induced cataract formation in rat lenses. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 5, n. 64, p. 761-766, 1996;

BARTHELEMY S. et al. Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat. **Res. Virol.**, v. 1, n. 149, p. 43-52, 1998;

BAYER E. A., MORAIS S., HEYMAN A. , BARAK Y., CASPI J., WILSON D. B. , LAMED R., SHOSEYOV O. Enhanced cellulose degradation by nano-complexed enzymes: Synergism between a scaffold-linked exoglucanase and a free endoglucanase. **Journal of Biotechnology**, Volume 147, Issues 3-4, June 2010, Pages 205-211.

BELDMAN, G.; SEARLE VAN LEEUWEN, M.; ROMBOUTS, F.; VORAGEN, F. G. J. The cellulase of *Trichoderma viride* purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and beta-glucosidases. **EuroPandan Journal of Biochemistry**, v. 2, n.146, p. 301-308, 1985;

BELTRAME, C.T.L. **Sistemas microemulsionados aplicados à remoção da cor de efluentes têxteis**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2006;

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. *Euro. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 57, 35;

BERGHEM, L.; PETTERSSON, L. G.; AXIOFREDRIKSSON, U. Mechanism of enzymatic cellulose degradation - characterization and enzymatic properties of a beta-1,4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. **EuroPandan Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 53, p. 55-62, 1975;

BEZERRA, C.M et al. Fibras Celulósicas. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Departamento de Engenharia de Produção Têxtil. Disponível em <http://clovisbezerra.tripod.com/materiais-didaticos/proqui-i/fibras-celulosicas.pdf>. Acesso em: fevereiro de 2010;

BISHNOI M.; CHOPRA K.; KULKARNI S. K. Protective effect of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, n. 88, p. 511-522, 2008;

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BUCKERIDGE, M. S.; SILVA, G. B.; CAVALARI, A. A.; Kerbauy, G.B. In: PAREDE CELULAR. **Fisiologia Vegetal** 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 165-181, 2008;

CALABRESE, V.; SCAPAGNINI, G.; COLOMBRITA, C.; RAVAGNA, A.; PENNISI, G.; GIUFFRIDA, Stella A. M. et al. Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach. **Amino Acids**, n. 25, p. 437-444, 2003;

CASTRO, Aline Machado de; PEREIRA, J.R. Nei. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, vol.33, n.1, pp. 181-188, 2010;

CAVACO PAULO, A.M. **Influência da Agitação Mecânica e da Composição Enzimática no Tratamento do Algodão com Celulases**. Dissertação – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 1995;

CAVACO PAULO, A.; TODOROVA, S. B.; SILVA, C. J. S. M.; SIMEONOV N. P. Cotton fabric: A natural matrix suitable for controlled release systems. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007, n. 40, p. 1646–1650;

CECÍLIO FILHO, A.B.; SOUZA, R.J.; BRAZ, L.T.; TAVARES, M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 171- 175, 2000;

CENI, G.C. **Oxidases de erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST.HILL)**: Extração, Estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões, Erechim, Rio Grande do Sul, 2005;

Choi, H.M.; Kim, J.H.; Shin, S. Characterization of cotton fabrics treated with glyoxal and glutaraldehyde. **J Appl Polym Sci**, n. 73, pp. 2691–2699, 1999;

Cotton Technical Guide, 2010. Disponível em: <http://www.cottoninc.com/Cotton-Nonwoven-Technical-Guide/> Acesso em: fevereiro de 2010;

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.

ÇIKRIKÇI et al. Biological Activity of Curcuminoids Isolated from *Curcuma longa*. **Records of Natural Products**, v. 2, n.1, p. 19-24, 2008;

DALLA VECCHIA, Roberto; NASCIMENTO, Maria da Graça; SOLDI, Valdir. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quím. Nova**. vol.27, n.4, pp. 623-630., 2004

ENARI, T.; NIKU PAAVOLA, M.; CRC Critical Reviews in Biotechnology, **CRC Press**, Vol. 5, n. 3, p. 67, 1987.

FERREIRA, L. A. F.; HENRIQUES, O. B.; ANDREONI, A. A. S.; VITAL, G. R. F.; Campos, M.M.C.; HABERMEHL, G.G. et al. Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**, n. 30 , p. 1211–1218, 1992.

FERSHT, A. Enzyme Structure and Mechanism, W. R. Freeman and Company, New York, , 1984, 2ed.

FUENTES, J. M.; ORTIZ ORTIZ, M. I. A.; MORÁN, J. M.; RUIZ MESA, L. M. ; NISO SANTANO, M.; BRAVO SANPEDRO, J. M.; GÓMEZ SÁNCHEZ, R.; GONZÁLEZ POLO, R. A. . Curcumin exposure induces expression of the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in rat mesencephalic cells. **Neuroscience Letters**, v. 468, p. 120–124, 2010;

GAMERITH, G.; GROICHER, R.; ZEILINGER, S.; HERZO, G. P.; KUBICEK, C. P. Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on hemicelluloses substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 38, p. 315-322, 1992.

GHONEIM, A. I.; ABDEL NAIM, A. B.; KHALIFA, A. E.; EL DENSHARY, E. S. Protective effects of curcumin against ischaemia/reperfusion insult in rat forebrain. **Pharmacol. Res.**, v. 46, p. 273-279, 2002;

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure Appl. Chem.**, v. 59, p. 257-268, 1986.

GOVINDARAJAN, V. S. Turmeric-chemistry, technology and quality. **CRC - Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.12, n.3, p.199-301, 1980.

Goyal A., Gosh B., Eveleigh D., Characteristics of Fungal Cellulases, **Bioresource Technology**, v. 36, p. 37-50, 1991;

Habeeb, A. F. S. A.; Hiramoto, R. Reaction of proteins with glutaraldehyde. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 126, p. 16-26, 1968;

HAFNER BRATKOVIC, I.; GASPERSIC, J.; SMID, L. M.; BRESJANAC, M.; JERALA, R. Curcumin binds to the alpha-helical intermediate and to the amyloid form of prion protein—a new mechanism for the inhibition of PrP(Sc) accumulation. **J. Neurochem.**, v. 104. P. 1553-1564, 2008;

HANn SY, CHOI SC. Dyeing properties of protein and synthetic fibers with the turmeric extracts. **J Korean Soc Dyers Finishers** 2000;12:43e50.

HANn SY, CHOI SC. Antibacterial activity and identification of the active compound from turmeric extract. **J Korean Soc Dyers Finishers** 2002;14:11e7.

HARRIS, M.; **Bioengineering of Cellobiohydrolases 1 and 2 from *Trichoderma reesei***. Disponível em: http://xray.bmc.uu.se/markh/cbh/EU_CBH1n2_big.gif. Acesso em 18 de maio de 2010.

HARRIS, M. I. N. C.; **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimentos**. 2. ed. São Paulo: Editora SENAC, 2003;

HAX, G. **Comparando os efeitos da utilização da Papaína e dos Ácidos Graxos Essenciais – AGE em lesões cutâneas: estudo experimental**. Dissertação, Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2009;

HESS, D. **Plant physiology**. New York, Springer-Verlag, 1975, p. 99-116;

Henrissat, B.; Teeri, T. T.; Warren, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Lett.**, v. 425, p. 352–354, 1998;

HSU, W.; CHEN, D ; SHIENB, J.; TILEY, L.; CHIOUA, S.; WANG, S.; CHANG, T.; LEE, Y.; CHANB, K. Curcumin inhibits influenza virus infection and hemagglutination activity. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1346–1351, 2010.

INANO, H. ; ONODA, M.; INAFUKU, N.; Kubota, M.; KAMADA, Y.; OSAWA, T.; KOBAYASHI, H.; WAKABAYASHI, K. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats, **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1835–1841, 2000;

JAYAPRAKASHA, G. K.; JAGAN, L.; RAO, M.; SAKARIAH, K. K.; Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 533–548, 2005;

JOVANOVIC, S. V.; STEENKEN, S.; BOONE, C. W. et al. H-Atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin, **J Am Chem Soc**, v. 121, p. 9677–9681, 1991;

KARLSSON, J.; SIIKA-AHO, M.; TENKANEN, M.; TJERNELD, F. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 99, n. 1, , p. 63-78, 9 out. 2002

KIMURA, I. Y. Remoção de Corantes Reativos contendo Grupos Vinilsulfona e Triazina por Adsorção e Coagulação/Floculação com Quitosana. 2001. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2001;

KING, E.J.; CAMPBELL, Diana M. International enzyme units an attempt at international agreement **Clinica Chimica Acta**, v. 6, n. 3, p. 301-306, mai 1961;

KOSHLAND, D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biol. Rev. Camb.Philos. Soc.**, v. 28, p. 416-436, 1953;

KUBICEK, C. P.; PENTTILA , M. E. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*, p. 49–72. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (ed.), ***Trichoderma and Gliocladium***, Taylor & Francis Ltd., London, United Kingdom, 1998, 2 ed.;

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 377–391, 2008;

KURUP V. P.; BARRIOS C. S.; RAJU R.; JOHNSON B. D.; LEVY M. B.; FINK J. N. Immune response modulation by curcumin in a latex allergy model. **Clin. Mol. Allergy**, v. 5, n.1, 2007;

LACHANCE, P.A.; GUHR, G. Role of phytochemicals in chronic disease prevention. In: LACHANCE, P.A. Nutraceutical: designer foods III: garlic, soy and licorice. Trumbull: **Food & Nutrition**, p. 323-328, 1997;

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970;

LCME, Laboratório Central de Microscopia Eletrônica. Disponível em: <http://www.lcme.ufsc.br/index.jsp?page=arquivos/Equipamentos2.html>, acesso em 07 de julho de 2010;

LIM G. P.; CHU T.; YANG F.; BEECH W.; FRAUTSCHY S. A.; COLE G. M. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 8370-8377, 2007;

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3, 1 ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, 594p;

LORENZETTI, D.L.; **ESTUDOS DE APLICAÇÃO DE LIPASES EM FORMULAÇÕES COSMÉTICAS** Dissertação (Pós-Graduação em Química), Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2007;

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; **J. Biol. Chem.** , 193, 265, 1951;

LUSA. **Exposição a nanopartículas de prata prejudica organismo**. 7 de setembro de 2009. Disponível em http://dn.sapo.pt/inicio/ciencia/interior.aspx?content_id=1441167 acesso em 22 de junho 2010;

LYND, L.R.; WEIMER P.J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v. 66, n. 3, p. 506-577;

MAIA, N. B.; BOVI, O. A.; DUARTE, F. R.; et al. Influência de tipos de rizomas de multiplicação no crescimento de *Cúrcuma longa* L. (*Cúrcuma*). **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 1, p. 33- 7, 1995;

MARTINS L. F.; **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertacao (Pos-Graduacao em Química), Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2005;

MARTINS, M. C.; RUSIG, O. Cúrcuma – um corante natural. **Boletim da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 53-65, 1992;

MATHAI, C. K. The pattern of rhizome yield and their accumulation of commercially important chemical constituents in turmeric (*Curcuma* spices) during growth and development. **Qualitas Plantarum Plant Foods For Human Nutrition**, The Hague, v. 28, n. 3, p. 219-225, 1979;

May, A.; Cecílio Filho, A.B.; Cavarianni, R.L.; Barbosa, J.C. Desenvolvimento e produtividade da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em função de doses de nitrogênio e potássio **REV. BRAS. PL. MED.**, Botucatu, v.7, n.3, p.72-78, 2005;

MIGNEAULT, I.; CATHERINE Dartiguenave; MICHEL J. Bertrand; KAREN C. Waldron Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques** v. 37, p. 790-802, nov 2004;

MILLER, G. L; “Use of dinitrosalicylle acid for determination of reducing sugar”, *Anal. Chem.* 11, 426-428, 1959.

MONIER-WILLIAMS, M. A **Sanskrit-English Dictionary**, Motilal Banarsidass Publishers Pvt., New Delhi, 1997;

NATARAJAN C.; BRIGHT J. J. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 168, p. 6506–6513, 2002;

NOVOZYMES. Manual Técnico enzima Novoprime 959 e 969. Ficha de informação novoprime ® 969. Disponível em www.novozymes.com acesso em 10 de abril de 2011.

NAVARRETE, F. C. **Caracterización estructural de fibras lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación**, Departament ENGINYERIA QUÍMICA, UPC Universitat politécnica de catalunya, jun 2002;

NOGAWA, M.; GOTO M.; OKADA H.; MORIKAWA Y. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **Curr. Genet.**, v. 38, p.329–334, 2001;

OHSHIRO, M.; KUROYANAGI, M.; UENO, A. Structures of sesquiterpenes from *Curcuma longa*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2202–2205, 1990;

OREFICE, R. L. Em **Biomateriais: Fundamentos &Aplicações**; ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S., eds.; Cultura Médica: Rio de Janeiro, 2006, cap. 4;

PARADKAR, A.; AMBIKE, A. A.; JADHAV, B. K.; MAHADIK, K. R.; **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, p. 281-286, 2004;

PÉRET-ALMEIDA, L; NAGHETINI, C.; NUNAN, E; JUNQUEIRA,R; GLÓRIA, M; *In vitro* antimicrobial activity of the ground rhizome, curcuminoid pigments and essential oil of *Curcuma longa* L. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 32, n. 3, p. 875-881, maio/jun., 2008.

PERI, S.; KARRA, S.; LEE, Y. Y.; KARIM, M. N. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 626–637, 2007;

RABELO, S.C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química Campinas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, jul 2007;

RACHANA, T.; Shailesh, S. D.; Girish, B. M. Mechanism(s) of turmeric-mediated protective effects against benzo(a)pyrene-derived DNA adducts. **Cancer Letters**, v. 175, p. 79–88, 2002;

REINIKAINEN, T.; DIVNE, C.; STAHLBERG, J.; RUOHONEN, L.; PETTERSSON, G.; KNOWLES, J. K.; TEERI, T. T.; JONES, T. A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265 (5171),p. 524-528, 1994;

ROSA, S. **Adsorção de corantes reativos utilizando sal quaternário de quitosana como adsorvente**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ROUVINEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, J. K.; JONES, T. A., Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 66, **249**, p. 380–386. 1990;

SAN LIN, R.I. Phytochemicals and antioxidants. In: GOLDBERG, I. (ed.). **Functional foods, designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 409.

SEBRAE Goiás, 2006. Disponível em <<http://www.sebraego.com.br/site/site.do?idArtigo=3525>>, acesso em junho de 2009;

SELBY, K. Purification and properties of C1-component of celulase complex. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 34, 1969;

SHASHIDHAR, T. R.; SULKERI, G. S.; GASTI, V. D. Correlation studies in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Journal of Agricultural Sciences**, v.31, n.3, p.217-20, 1997;

SHARMA S.; KULKARNI S. K.; AGREWALA J. N.; CHOPRA K. Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 536, p. 256–61, 2006;

SILVA FILHO , C. R. M.; SILVA , T. M. S.; SOUZA, A. G.; DA CONCEIÇÃO, M. M.; DA SILVA, T. G.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v.19, n.4, Out./Dez. 2009;

SILVA, G. Açafrão: O ouro da cozinha. **Globo Rural**, n.110, p.38-43, 1994;

Silva, L. L.; **Avaliação do efeito do sal volátil carbamato de amônio sobre a estabilidade de enzimas.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paul, Agosto de 2008;

SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian curcuma species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 45, p. 75-81, 2002a.

SINGH, R.; CHANDRA, R.; BOSE, M.; LUTHRA, P.M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Science**, v. 83, n. 6, p. 737-740, 2002b.

SOLOMONS, G. T. W. **Química Orgânica**. V. 2, 9 Ed., 2008;

SOUZA et al. Enciclopédia agrícola brasileira, v. 5, N-R, coord. Júlio Seabra Inglez de Souza et alii, 1995;

SRINIVAS, P. ; PARVATHY K. S.; NEGI, P.S. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin-b-diglucoside. **Food Chemistry**, v. 115, p. 265–271, 2009;

SRIVASTAVA K. C.; BORDIA A.; VERMA S. K. Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 52, n. 4, p. 223-227, 1995;

SRIVASTAVA R.; DIKSHIT M.; SRIMAL R. C.; DHAWAN B. N. Anti-thrombotic effect of curcumin. **Thromb. Res.**, v. 40, n. 3, p. 413-417, 1985;

SUI Z.; SALTO R.; LI J.; CRAIK C.; ORTIZ de Montellano P. R. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 1, n. 6, p. 415-422, 1993;

SUMANONT Y.; MURAKAMI Y.; TOHDA M.; VAJRAGUPTA O.; WATANABE H.; MATSUMOTO K. Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin. **Life Sci**, v. 78, p. 1884–1891, 2006;

SUZUKI M.; NAKAMURA T.; IYOKI S.; FUJIWARA A.; WATANABE Y.; MOHRI K. et al. Elucidation of anti-allergic activities of curcumin-related compounds with a special reference to their anti-oxidative activities. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 1438–1443, 2005;

TAKAHASHI, M.Y. **Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões de qualidade e identidade**. 2 ed. São Paulo, 1987. 33 p.;

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. **J. Biochem.**, v. 125, p. 728–736, 1999;

TEERI, T. T.; KOIVULA, A.; Linder, M.; WOHLFAHRT, G.; DIVNE, C.; JONES, T. A. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? **Biochem. Soc. Trans.**, v. 26, p. 173–178, 1998;

THIBODEAU, G. A.; PATTON, K.T. **Estrutura e Funções do Corpo Humano**. 11 ed. Editora Manole Ltda, 2002z

TONNESEN, H. H. Solubility, chemical and photochemical stability of curcumin in surfactant solutions, **Pharmazie**, v. 57, n. 12, p. 820-824, 2002;

TONNESEN, H.H.; KARLSEN, J. Studies of curcumin and curcuminoids: VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solutions. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 180, p. 402-404, 1985;

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.) **Methods in plant. biochemistry, assays for bioactivity**. Londres: Academic Press, 1991. p. 47-69.

WALT, D.R.; AGAYN, V. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends Anal. Chem.**, v. 13, p. 425-430, 1994;

WALKER L.P.; WILSON D. B.; Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: an Overview, **Bioresource Technology**, v. 36, p. 3-14, 1991;

WANG, Y.; LU, Z.; WU, H.; LV, F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 71-74, 2009;

WANG R.; XU Y.; WU H. L.; LI Y. B.; LI Y. H.; GUO J. B.; LI X.J. The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v.578, n.1, p. 43-50, 2008;

WANG, Y. J.; PAN, M. H.; CHENG A. L. et al., Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 15, pp. 1867-1876, 1997;

WIPASA, J.; KOOSIRIRAT, C.; LINPISARN, S.; CHANGSOM, D.; CHAWANSUNTATI, K. Investigation of the anti-inflammatory effect of *Curcuma longa* in *Helicobacter pylori*-infected patients. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 815-818, 2010;

WONGCHAROEN, W.; PHROMMINTIKUL, A. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases . **International Journal of Cardiology**, v. 133, p. 145-151, 2009;

XU Y.; KU B. S.; YAO H. Y.; LIN Y. H.; MA X.; ZHANG Y. H. et al. The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.518, p.40-46, 2005;

YEH C. H.; LIN Y. M.; WU Y. C.; LIN P. J. Inhibition of NF- κ B activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrixmetalloproteinase expression. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 45, p. 301–309, 2005;

YEH, Y.-C. H.; CHEN, S. H. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 192-199, 5 January 2010;

YOSHIOKA, S.A.; BRAILE, D.M.; RAMIREZ, V.; GOISSIS, G. Reticulação de matrizes Colagênicas com diacetais de glutaraldeído para preparação de novos biomateriais. **Polímeros: Ciencia e Tecnologia**, Out./Dez. 1995;

ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thaïs B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quím. Nova**, vol.21, n.6, p. 787-793, 1998;

ZBARSKY V.; DATLA K. P.; PARKAR S.; RAI D. K.; ARUOMA O. I.; DEXTER D. T. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Free Radic. Res.**, v. 39, p. 1119–1125, 2005;

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797–824, 2004

ANEXOS

ANEXO A – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO TRABALHO.



Figura A1: Espectrofotômetro V-1200 marca pró-análise



Figura A4: Rama



Figura A2: Jigger



Figura A5: Estufa



Figura A3: espectrofotômetro UV-VIS

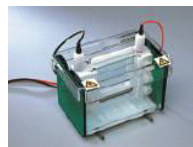


Figura A6: Cuba de eletroferese



Figura A7: Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo JEOL JSM-6390LV. Fonte: LCME, 2010.

ANEXO B - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

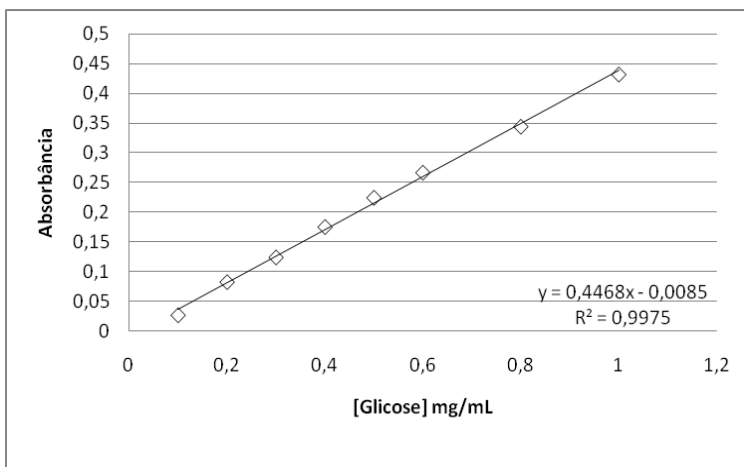


Figura B1: Curva de calibração para análise de açúcares redutores totais usada nos ensaios de atividade celulásica descritos no item 3.2.2.4 usando tampão acetato.

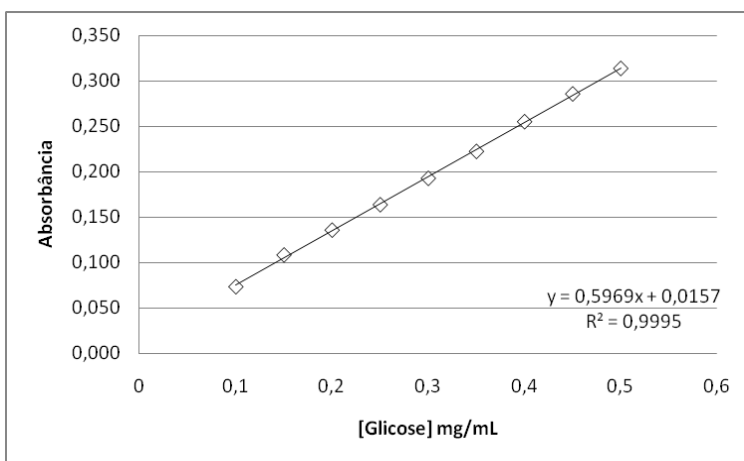


Figura B2: Curva de calibração para análise de açúcares redutores totais usada nos ensaios de atividade celulásica descritos no item 3.2.2.4 usando tampão suor.

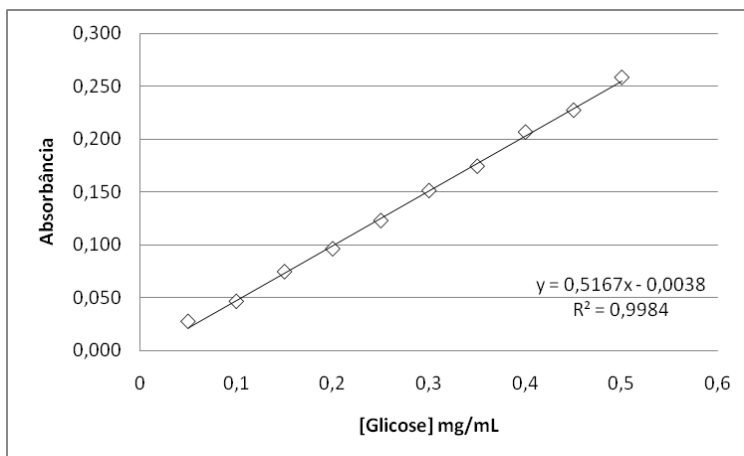


Figura B3: Curva de calibração para análise de açúcares redutores totais usada nos ensaios de atividade da enzima imobilizada no tecido.

ANEXO C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PELOS MÉTODOS DE BRADFORD (1976) E LOWRY (1951).

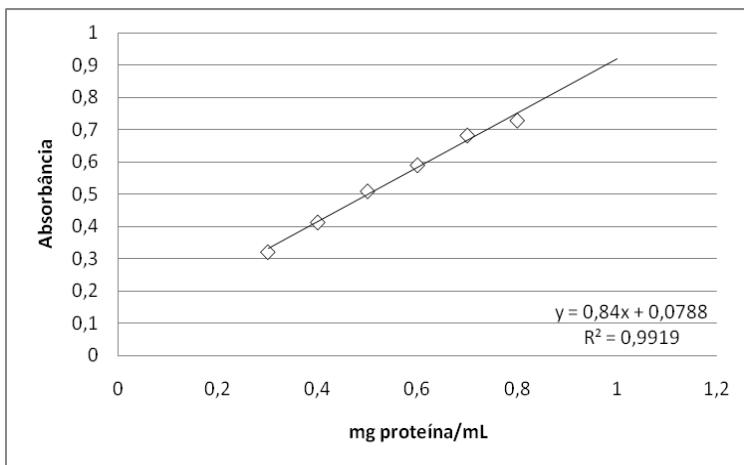


Figura C1: Determinação de proteína no caldo enzimático, utilizando o método de Bradford(1976).

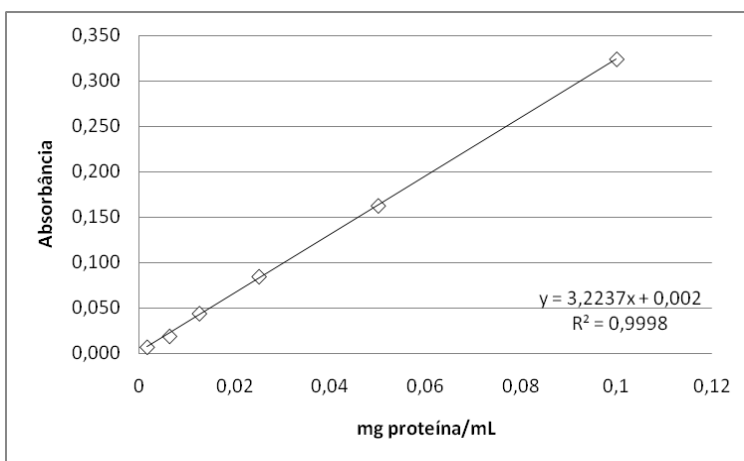


Figura C2: Determinação de proteína durante a imobilização enzimática (item 3.2.5), utilizando o método de Bradford (1976).

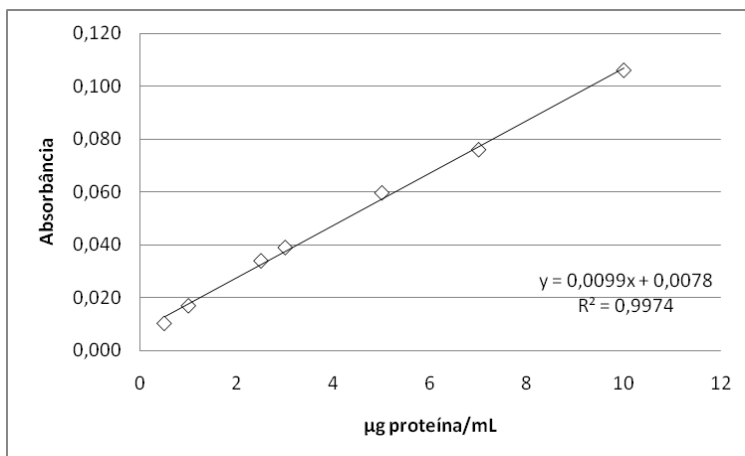


Figura C3: Determinação de proteína durante a liberação controlada. (item 3.2.6), utilizando o método de Bradford (1976).

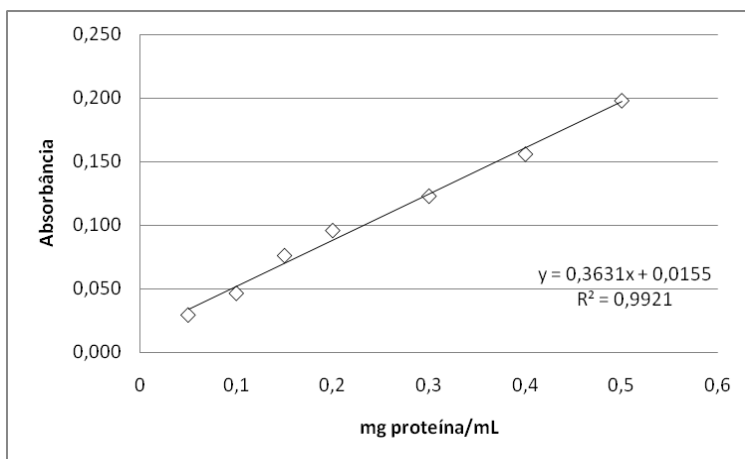


Figura C4: Determinação de proteína no caldo enzimático, utilizando o método de Lowry (1951).

ANEXO D: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO.

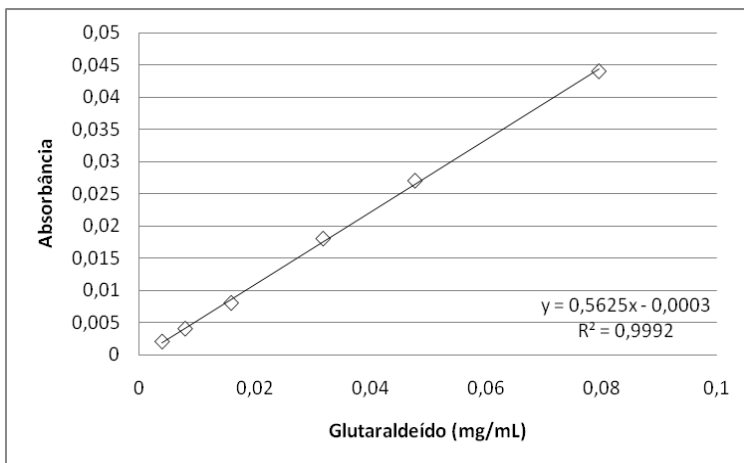


Figura D1: Curva de Calibração para a determinação de glutaraldeído nos itens

ANEXO E: CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS CORANTES SINTÉTICOS

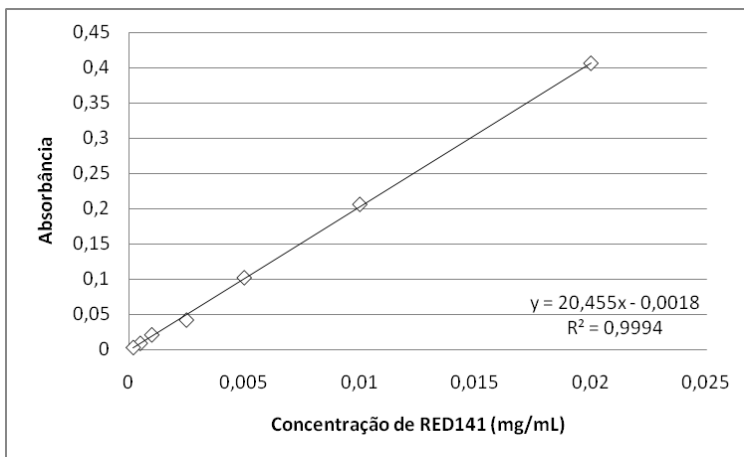


Figura E1: Curva de calibração do corante Vermelho 141 em água.

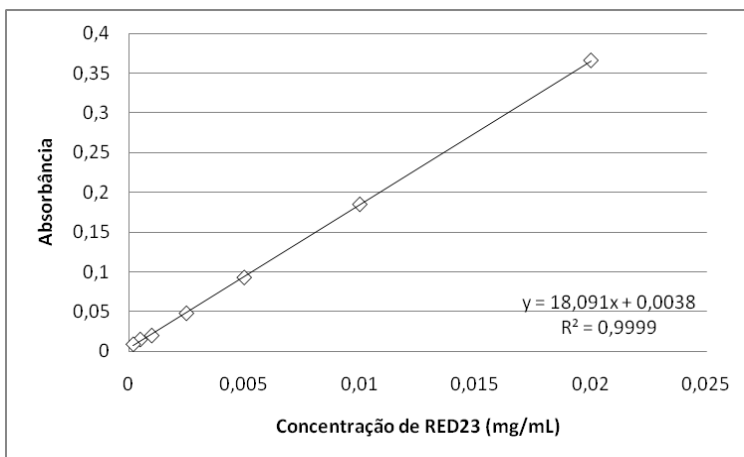


Figura E2: Curva de calibração do corante Vermelho 23 em água.

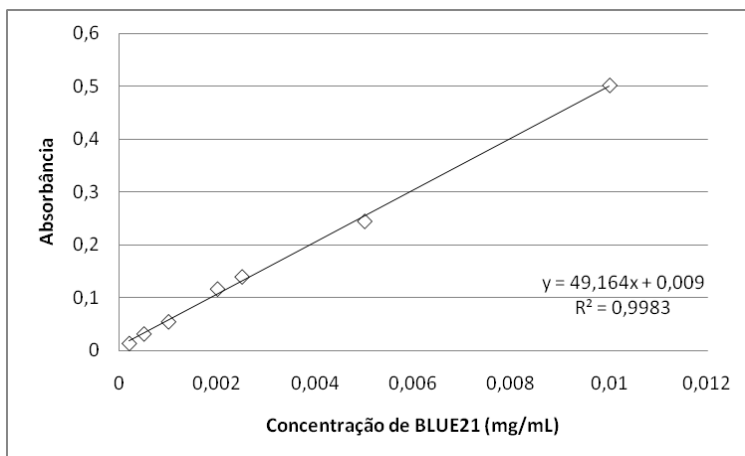


Figura E3: Curva de calibração do corante Azul 21 em água.

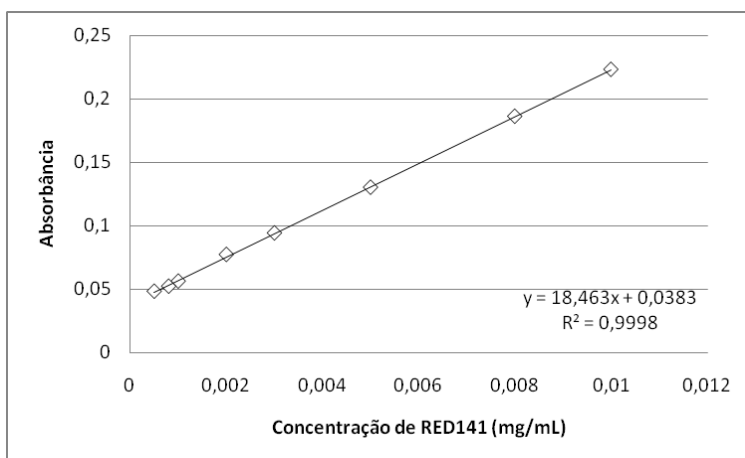


Figura E4: Curva de calibração do corante C.I. Vermelho 141 em tampão suor

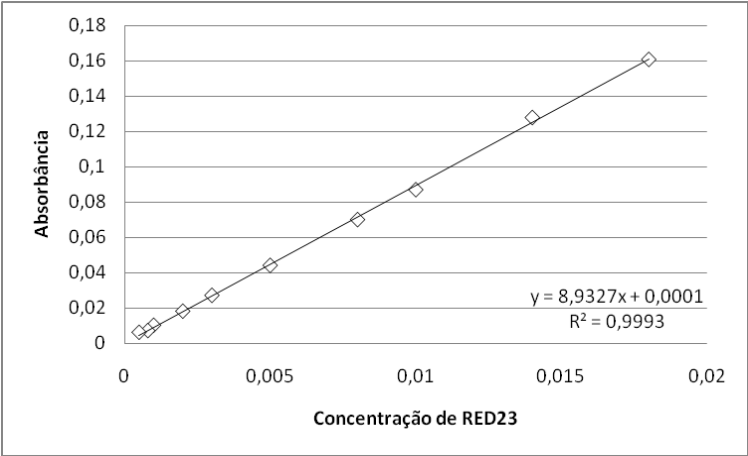


Figura E5: Curva de calibração do corante C.I. Vermelho 23 em tampão acetato.

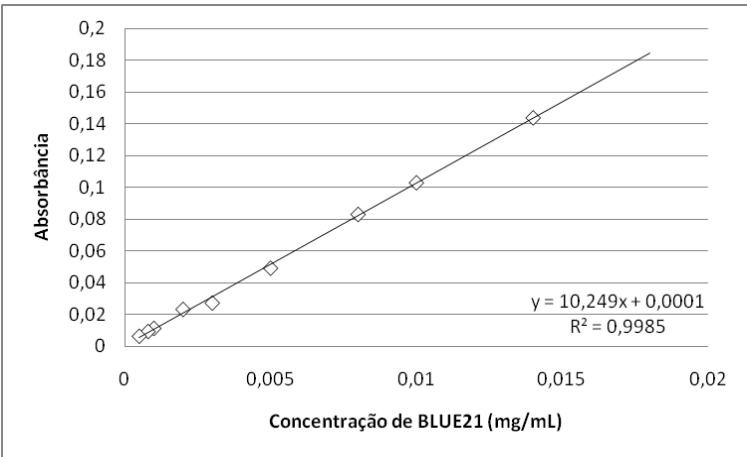


Figura E3: Curva de calibração do corante C.I. Azul 21 em tampão acetato.